



Universidade do Porto

FEUP Faculdade de
Engenharia

**ASSOCIAÇÃO DO EXTRACTO DE *EQUISETUM ARVENSE* AO BONELIKE®:
ACTIVIDADE OSTEOGÉNICA E ANTIMICROBIANA**

Joaquim António Oliveira e Cunha

Licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública
pela Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Coimbra

Porto, Julho de 2008

Dissertação submetida para satisfação parcial dos requisitos do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica (Área de especialização de Biomateriais),
realizada sob orientação da
Professora Doutora Maria Ascensão Ferreira da Silva Lopes
da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
e sob co-orientação do
Professor Doutor João Miguel Silva e Costa Rodrigues
da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Dedico esta tese à
minha esposa, Sílvia, e aos meus queridos Pais

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Ascensão Lopes e Professor Doutor João Miguel Rodrigues, a sua preciosa ajuda, coragem e paciência.

Um obrigado especial à Catarina Bessa Pereira, que efectuou um óptimo trabalho, cujos resultados serviram de alicerce à presente tese.

Agradeço também ao Professor Doutor Luís Mira Vieira (ICBAS) pelo apoio na preparação dos extractos, ao Doutor Nandyala Sooraj Hussein (FEUP) pelo companheirismo e precioso apoio na preparação dos biomateriais, à Professora Doutora Maria Pia Ferraz (UFP) pela ajuda nos ensaios microbiológicos e à Professora Doutora Maria Helena Fernandes (FMDUP) pela cooperação e apoio nos ensaios celulares.

Agradeço à minha colega e amiga Sofia Pinho a sua ajuda como ilustradora.

Estou também grato a todos os meus colegas de investigação, em particular ao Daniel Cardoso, Rita Pinheiro, Marta Laranjeira e Pedro Gomes, pois sem eles este trabalho teria sido bem menos prazeroso.

RESUMO

O recurso a biomateriais constitui uma prática clínica corrente em estratégias de regeneração óssea. Actualmente reconhece-se que a hidroxiapatite, embora quimicamente muito semelhante à componente mineral da matriz extracelular do tecido ósseo, apresenta bioactividade limitada, principalmente devido à sua reduzida solubilidade no meio fisiológico e baixa resistência mecânica. Assim, vários estudos experimentais demonstraram as vantagens da associação da mesma a biovidros, nomeadamente vidros do sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$. O Bonelike[®] é um biomaterial patenteado que foi desenvolvido a partir dessa associação.

Por outro lado, nas medicinas tradicionais, utiliza-se uma grande variedade de plantas para tratar doenças ósseas, sendo a *Equisetum arvense* uma delas. Esta planta possui algumas particularidades, entre as quais se destacam o elevado teor em silício e o efeito antimicrobiano. É também de salientar a sua abundância e baixo custo.

Neste trabalho avaliou-se o efeito do extracto hidrometanólico de *E. arvense* no comportamento osteoblástico, na linha celular MG63 e em culturas celulares de medula óssea humana. Com base neste estudo, associou-se o extracto de *E. arvense* com o Bonelike[®], com o intuito de avaliar o desempenho desta associação relativamente à proliferação e diferenciação osteoblástica. Analisaram-se diversos aspectos, tais como, optimização do método de impregnação do extracto no biomaterial, a cinética da sua libertação em ambiente fisiológico simulado, e, finalmente, o comportamento biológico da associação Bonelike[®]/*E. arvense*. Este último parâmetro foi avaliado *in vitro*, recorrendo a culturas da linha celular MG63. Conjuntamente, avaliou-se a actividade antimicrobiana do extracto de *E. arvense* em *Staphylococcus aureus*, o qual é responsável por muitas das infecções ósseas.

Os resultados mostram que concentrações de extracto iguais ou inferiores a 0,1 mg/ml provocam um efeito estimulador na proliferação celular, especialmente evidente na linha celular MG63, e na diferenciação osteoblástica, nomeadamente uma antecipação significativa na formação de

uma matriz extracelular mineralizada, nas culturas celulares de medula óssea humana. A presença de concentrações iguais ou superiores a 0,5 mg/ml resulta num efeito inibitório do comportamento osteoblástico. Simultaneamente, os níveis osteoindutores também estão associados a actividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Em conclusão, o extracto hidrometanólico de *E. arvense* apresenta propriedades osteoindutoras e a sua associação ao Bonelike® parece aumentar a bioactividade deste substituto ósseo. Estes resultados indiciam um elevado potencial em estratégias de regeneração óssea.

ABSTRACT

The use of biomaterials constitutes a current clinical practice in bone regeneration strategies. At present is recognized that hydroxyapatite, although chemically very similar to the mineral component of bone tissue extracellular matrix, presents limited bioactivity, mainly due to reduced solubility in the physiological environment and low mechanical resistance. Thus, several experimental studies showed the advantages of the association with bioglasses, namely glass of the system $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$. Bonelike[®] is a patented biomaterial that was developed from that association.

On the other hand, in traditional medicines, a great variety of plants is used to treat bone illnesses, being *Equisetum arvense* one of them. This plant has some particularities, being the main one its elevated content in silicon and the antimicrobial effect. It is also important to highlight its abundance and low cost.

In this work the effect of hydromethanolic extract of *E. arvense* in osteoblastic behaviour was evaluated in MG63 cellular line and in human bone marrow cellular cultures. Based in this study, the extract of *E. arvense* was associated with Bonelike[®] aiming to evaluate the performance of this association concerning the osteoblastic proliferation and differentiation. Several aspects had been analyzed, such as, optimization of the extract impregnation method in the biomaterial, extract release kinetic in simulated physiological environment, and, finally, the biological behaviour of Bonelike[®]/*E. arvense* association. This last parameter was tested *in vitro* through MG63 cellular line culture. Furthermore, the antimicrobial activity of *E. arvense* extract was evaluated against *Staphylococcus aureus*, which is responsible of many bone infections.

The results reveal that concentrations of the extract up to 0,1 mg/ml had a stimulatory effect in the cellular proliferation, especially evident through MG63 cell line, and in the osteoblastic differentiation, with a significant earlier formation of the mineralized extracellular matrix of the cellular cultures of human bone marrow. Concentrations equal or higher than 0,5 mg/ml results in a

inhibitory effect of the osteoblastic behaviour. Simultaneously, the osteoinduction levels are also associated to antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*.

In conclusion, the hydromethanolic extract of *E. arvense* presents osteoinductive properties and its association to Bonelike[®] seems to increase the bioactivity of this bone substitute. These results suggest a high potential in bone regeneration strategies.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Tecido ósseo	21
1.1.1 Remodelação óssea	23
1.1.2 Osteoblastos	24
1.1.3 Osteócitos	26
1.1.4 Osteoclastos	27
1.1.5 Alterações do metabolismo ósseo	29
1.2 Biomateriais	31
1.2.1 Classificação	32
1.2.2 Osteointegração	33
1.2.3 Enxertos ósseos	34
1.2.4 Hidroxiapatite reforçada com vidro: Bonelike®	35
1.3 Fitoterapia	37
1.3.1 <i>Equisetum arvense</i>	37
1.3.2 Efeito do silício no metabolismo	39
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43
2.1 Preparação do material compósito Bonelike®	43
2.1.1 Preparação da hidroxiapatite	43
2.1.2 Preparação do vidro	44
2.1.3 Preparação do Bonelike®	45
2.2 Preparação do extracto hidrometanólico (HM) de <i>E. arvense</i>	45

2.3	Actividade osteoblástica do extracto de <i>E. arvense</i>	46
2.3.1	Culturas celulares	46
2.3.2	Caracterização das culturas celulares	48
2.4	Actividade antibacteriana do extracto de <i>E. arvense</i>	49
2.5	Impregnação do Bonelike® com o extracto de <i>E. arvense</i>	50
2.5.1	Estudos de libertação do extracto em PBS	51
2.6	Actividade osteoblástica do Bonelike®/ <i>E. arvense</i>	51
3.	RESULTADOS	53
3.1	Análise física da hidroxiapatite e do Bonelike®	53
3.2	Actividade biológica do extracto de <i>E. arvense</i>	54
3.2.1	Efeito na proliferação e diferenciação osteoblástica	54
3.2.2	Efeito antibacteriano	59
3.3	Sistema Bonelike®/ <i>E. arvense</i>	60
3.3.1	Associação do Bonelike® com o extracto de <i>E. arvense</i>	60
3.3.2	Actividade osteoblástica do sistema Bonelike®/ <i>E. arvense</i>	62
4.	DISCUSSÃO	65
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	69
6.	REFERÊNCIAS	71
7.	ANEXOS	79
	Anexo I – Cálculos para a preparação da hidroxiapatite	79
	Anexo II – Cálculos para a preparação do vidro	81
	Anexo III – Fichas de DRX da HA, α -TCP e β -TCP	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical e o osso trabecular (adaptado de 1).....	22
Figura 2. Estrutura de um osso longo (adaptado de 5).	23
Figura 3. Esquema representativo da remodelação óssea.	24
Figura 4. Osteoclasto humano observado por microscopia electrónica de varrimento	28
Figura 5. Exemplos de biomateriais e sua distribuição no corpo humano (adaptado de 38).	32
Figura 6. <i>Equisetum arvense</i> . Principais características morfológicas e corte transversal (adaptado de 60).....	39
Figura 7. Ciclo de aquecimento da hidroxiapatite.....	43
Figura 8. Ciclo de aquecimento do vidro.	44
Figura 9. Ciclo de aquecimento do compósito.....	45
Figura 10. Espectro de DRX da hidroxiapatite.	53
Figura 11. Espectro de DRX do Bonelike®.	54
Figura 12. Viabilidade/proliferação da linha celular MG63 na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes do extracto de <i>E. arvense</i>	55
Figura 13. Proliferação das células da medula óssea humana na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes do extracto de <i>E. arvense</i>	56
Figura 14. Actividade da ALP na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes do extracto de <i>E. arvense</i>	57
Figura 15. Imagens de culturas celulares de medula óssea humana cultivadas na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes	

de extracto de <i>E. arvense</i> , coradas pelo método de von Kossa (ampliação 50 x).	58
Figura 16. Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> na ausência (Controlo) ou presença de diferentes concentrações do extracto de <i>E. arvense</i>	59
Figura 17. Viabilidade/proliferação da linha celular MG63 em contacto com o sistema Bonelike [®] / <i>E. arvense</i> (E) e Bonelike [®] /DMSO (C) (sem pré-incubação).	63
Figura 18 Viabilidade/proliferação da linha celular MG63 em contacto com o sistema Bonelike [®] / <i>E. arvense</i> (E) e Bonelike [®] /DMSO (C) (com pré-incubação).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções de impregnação testadas.....	60
Tabela 2. Quantidade de extracto (mg/dl) libertado para o PBS.	61

ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

As preparações herbais são usadas, há muito tempo, na medicina tradicional, para o tratamento de inúmeras situações clínicas, nomeadamente para o tratamento ósseo após cirurgias ou fracturas. De facto, estudos recentes revelaram que *E. arvense* possui propriedades estimuladoras da regeneração óssea, bem como efeito antimicrobiano.

Neste contexto, a associação do extracto desta planta a um substituto ósseo sintético, como o Bonelike[®], poderia revelar-se de grande utilidade, potenciando a acção de ambos num contexto clínico de regeneração óssea.

Numa primeira fase do trabalho, pretendeu-se avaliar a actividade biológica do extracto de *E. arvense* no comportamento osteoblástico de uma linha celular derivada de osteosarcoma humano (MG63) e em células da medula óssea humana. Paralelamente, avaliar também a actividade antibacteriana do mesmo extracto em *Staphylococcus aureus*, uma vez que esta estirpe é responsável por muitas das infecções ósseas.

Seguidamente, pretendeu-se a obtenção de grânulos de Bonelike[®] contendo extracto de *E. arvense*, de forma a libertarem o mesmo em quantidades compatíveis com o efeito estimulatório observado anteriormente.

Finalmente, pretendeu-se avaliar o efeito dos grânulos contendo extracto de *E. arvense* na proliferação/viabilidade de células MG63.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, sendo o mais resistente e rígido do corpo humano. As suas principais funções são (1):

- Mecânica (sustenta o corpo, servindo de suporte para as partes moles e permite a realização de movimentos úteis a partir das contracções dos músculos esqueléticos);
- Protectora (protege órgãos internos vitais, como os contidos nas caixas craniana, torácica e canal raquidiano e envolve a medula óssea, local de hematopoiese);
- Metabólica (armazena diversos iões, sendo o principal depósito de cálcio e fosfato e contribui para a homeostase mineral libertando-os de forma controlada).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e material extracelular mineralizado (1). Esta matriz óssea é composta por uma parte orgânica e uma parte mineral. A parte mineral é composta por sais cristalinos, principalmente de fosfato de cálcio (hidroxiapatite), correspondendo a cerca de 50% da massa seca do osso. A parte orgânica é composta maioritariamente por colagénio (cerca de 90%) e por outras proteínas não colagénicas, como osteonectina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e proteoglicanos.

Com base na sua porosidade, o tecido ósseo é geralmente classificado em dois tipos, diferindo entre si quanto à densidade, orientação espacial dos seus componentes orgânicos e minerais e localização no esqueleto (figura 1).

- Osso cortical (ou compacto): Corresponde a 80% do esqueleto adulto, é mais denso e está localizado na camada exterior de todos os ossos, predominando nas diáfises dos ossos longos. 60% da massa total do

osso cortical corresponde a substâncias inorgânicas, 28% são substâncias orgânicas e os restantes 12% correspondem a água (2, 3).

- Osso trabecular (ou esponjoso): Corresponde aos restantes 20%, é menos denso e está localizado no interior de todos os ossos, predominantemente nas epífises dos ossos longos. 38% da massa total corresponde a substâncias inorgânicas, 35% são substâncias orgânicas e os restantes 27% correspondem a água (2, 3).

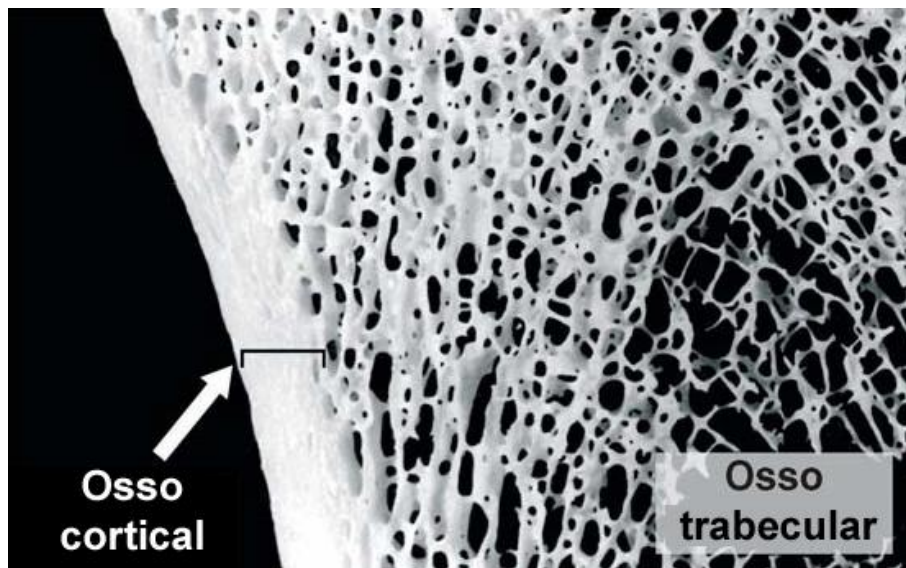


Figura 1. Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical e o osso trabecular (adaptado de 1).

Anatomicamente, os ossos longos apresentam um eixo tubular denominado diáfise. No centro desta secção, encontra-se a cavidade medular composta por medula óssea amarela. As extremidades deste tipo de ossos denominam-se epífises. A separar estas duas estruturas, encontram-se as metáfises. Uma membrana fibrosa composta por tecido conjuntivo denso e vasos sanguíneos, denominada perióstio, reveste a superfície externa do osso. A revestir a superfície interna (cavidade e espaços medulares, canais de Havers e Volkmann), encontra-se o endóstio (4) (figura 2).

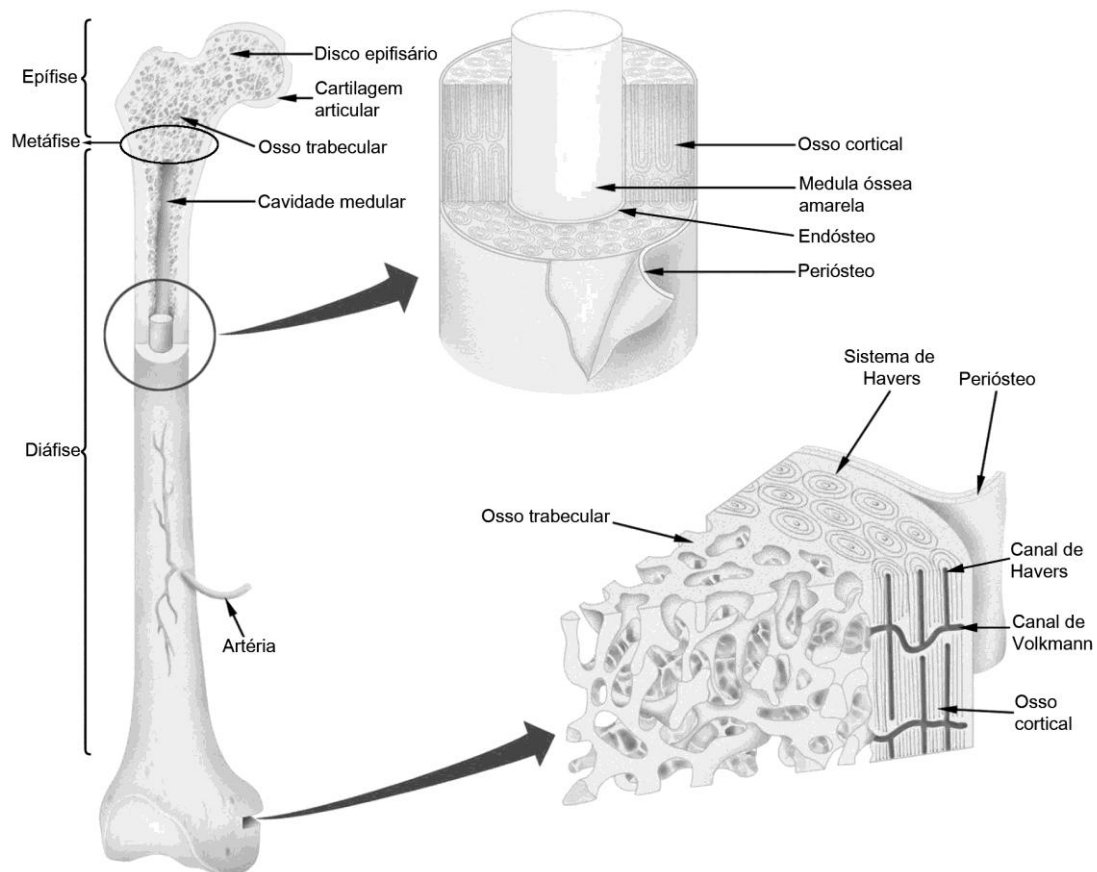


Figura 2. Estrutura de um osso longo (adaptado de 5).

1.1.1 Remodelação óssea

O tecido ósseo encontra-se em permanente remodelação. Este processo é extremamente dinâmico, ocorrendo ao longo de toda a vida. A remodelação óssea é uma consequência do balanço entre a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e a formação óssea mediada pelos osteoblastos. É este processo que assegura a homeostasia do cálcio e do fósforo e também a reparação de danos do osso. Os osteoblastos sintetizam os precursores moleculares da matriz óssea e regulam a sua mineralização. À medida que progride o processo de formação óssea, os osteoblastos preenchem as lacunas de reabsorção criadas pelos osteoclastos produzindo osteóide. Os osteoblastos que ficam retidos na própria matriz passam a denominar-se osteócitos (6) (figura 3).

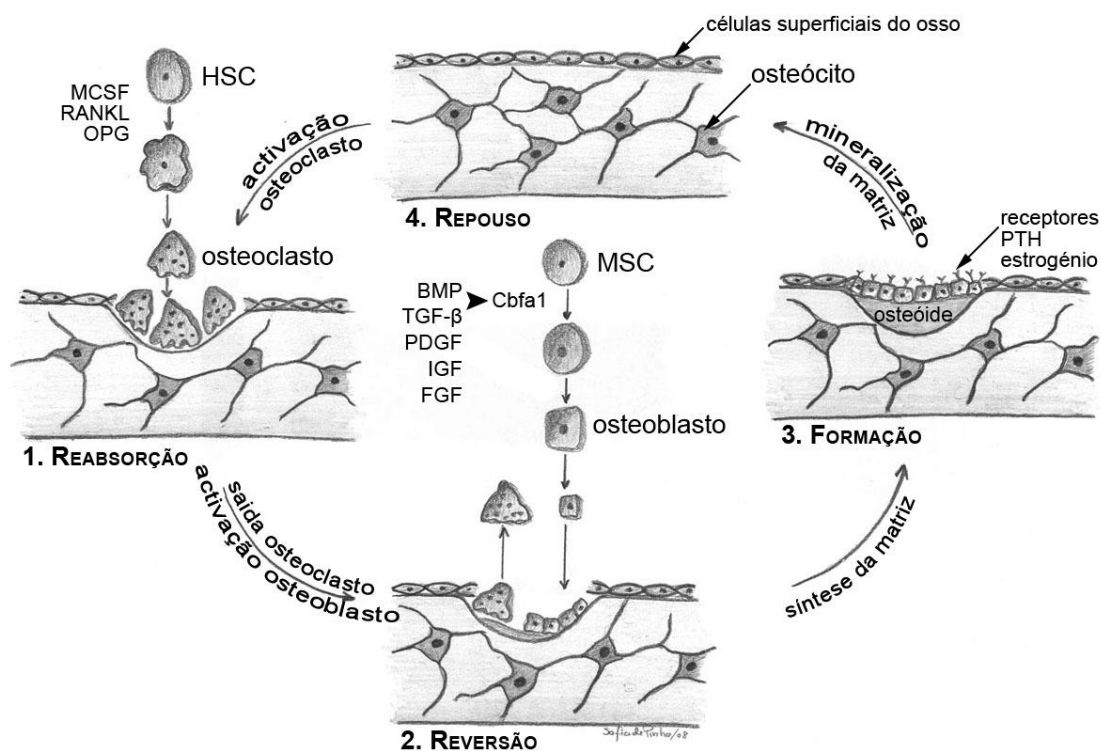


Figura 3. Esquema representativo da remodelação óssea.

1.1.2 Osteoblastos

Os osteoblastos têm origem em células progenitoras mesenquimatosas (*mesenchymal stem cells* – MSC) do estroma da medula óssea, que também originam condroblastos, fibroblastos, adipócitos e miócitos. Inicialmente, os precursores osteoblásticos mesenquimatosos diferenciam-se em células pré-osteoblásticas não funcionais e, posteriormente, em osteoblastos maduros, capazes de formar osso (7).

Do ponto de vista morfológico, os osteoblastos são células uninucleadas com forma variável, que reflecte o nível da sua actividade celular. Nos estados tardios de maturação, dispõem-se ao longo da superfície formadora do osso. Os osteoblastos produzem diversas moléculas importantes para o metabolismo ósseo, nomeadamente, precursores do colagénio tipo I, osteocalcina (proteína não colagénica mais abundante na matriz óssea), sialoproteína óssea,

proteoglicanos e fosfatase alcalina (enzima que cliva fosfatos de compostos orgânicos) (8, 9).

O factor de transcrição Cbfa1 (*core binding factor a1*) desempenha um papel central na diferenciação osteoblástica. Este factor de transcrição é o marcador mais precoce e específico da osteogénese, pois induz a diferenciação dos osteoblastos, controla a formação de material ósseo pelos osteoblastos diferenciados e regula a expressão da osteocalcina (10). Ratos deficientes em Cbfa 1 apresentam um esqueleto apenas formado por cartilagem, pois a diferenciação osteoblástica encontra-se comprometida (11). Estes ratos são igualmente desprovidos de osteoclastos, o que demonstra a relação dinâmica que existe entre estes dois tipos de células vitais para o tecido ósseo, evidenciando a necessidade da presença de osteoblastos para que ocorra a diferenciação dos osteoclastos. Actualmente, não são ainda conhecidos os detalhes moleculares que controlam a expressão do Cbfa1. Sabe-se, no entanto, que proteínas morfogénicas do osso (*bone morphogenetic proteins* – BMP) podem induzir a expressão de Cbfa 1 *in vitro* (10). Foi demonstrado também que o factor de crescimento transformante β (*transforming growth factor β* – TGF- β) controla a diferenciação dos osteoblastos e modula a expressão do gene que codifica para o Cbfa 1, e que outros factores, tais como o factor de crescimento dos fibroblastos (*fibroblast growth factor* – FGF), também são importantes na diferenciação dos osteoblastos (10).

Algumas substâncias, como hormonas e factores de crescimento, e estímulos, como a actividade física, afectam o metabolismo ósseo, actuando ao nível dos osteoblastos (12). Por exemplo, os osteoblastos possuem receptores para a paratormona (*parathyroid hormone* – PTH) e para os estrogénios (13).

A presença de factores de crescimento locais, produzidos pelos próprios osteoblastos, pode estimular a formação óssea. A família dos TGF- β encontra-se representada, no tecido ósseo, pelas BMP e pelo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Estes são sintetizados pelo osteoblasto, sob a forma de precursores inactivos (14). A concentração local de TGF- β é regulada por hormonas, como a PTH e os estrogénios, bem como, por proteases osteoclásticas, que clivam as formas precursoras desses factores de crescimento. Os TGF- β estimulam a proliferação e a diferenciação dos precursores dos osteoblastos e estimulam a

síntese de proteínas da matriz óssea pelo osteoblasto maduro (15). Além disso, os TGF- β , que são libertados durante o processo de reabsorção óssea, participam na apoptose dos osteoclastos, constituindo um sinal para o fim da reabsorção e recrutam osteoblastos para a lacuna de reabsorção, o que permite reiniciar o processo de formação de novo material ósseo (16). Deste modo, os TGF- β não só estimulam a formação de novo material ósseo, como intervêm no processo de interacção entre a formação e a reabsorção óssea. Outros factores, que actuam como indutores da formação óssea, são as BMP, sobretudo as BMP numeradas de 2 a 8, que estruturalmente são muito semelhantes aos TGF- β 1 e TGF- β 2. As BMP são reconhecidas por receptores diferentes, mas apresentam funções muito semelhantes aos TGF- β , sendo potentes indutores da diferenciação osteoblástica. Actuam aumentando a expressão do factor de transcrição Cbfa1 específico dos osteoblastos (17, 18).

Outros factores importantes na regulação óssea são o factor de crescimento semelhante à insulina (*insulin like grow factor* – IGF) 1 e 2, o factor de crescimento derivado das plaquetas (*platelet derived growth factor* – PDGF) e os FGF 1 e 2. Todos estes factores são produzidos pelos osteoblastos e actuam no microambiente ósseo, estimulando a proliferação e a diferenciação dos precursores osteoblásticos, ou aumentando a capacidade de síntese de novo material ósseo por parte dos osteoblastos maduros (19, 20).

1.1.3 Osteócitos

Os osteócitos são células derivadas dos osteoblastos. Durante a deposição da matriz óssea, alguns osteoblastos ficam retidos em lacunas, onde se diferenciam em osteócitos. Esta diferenciação é caracterizada pela perda de grande parte dos organelos citoplasmáticos e pela formação de canalículos (canais microscópicos que provêm de prolongamentos citoplasmáticos). Estes canais permitem a comunicação com vasos sanguíneos e células adjacentes, sendo essenciais nas funções e viabilidade dos osteócitos (1, 4).

Estas células, com a sua ampla distribuição ao longo da matriz óssea e elevado grau de interconectividade, são sensíveis a estímulos ambientais e

mecânicos. Transformam esses estímulos em sinais bioquímicos de formação ou reabsorção óssea, conduzindo a, respectivamente, deposição ou remoção de minerais das lacunas. Portanto, são responsáveis, quer pela manutenção da matriz óssea, quer pela libertação de cálcio e fósforo do osso mineralizado para a corrente sanguínea (21).

1.1.4 Osteoclastos

Os osteoclastos, células efectoras do processo de reabsorção óssea, são derivados de células hematopoiéticas da linhagem dos monócitos (*hematopoietical stem cells* – HSC). Os osteoclastos apresentam uma morfologia característica. São células multinucleadas que desenvolvem um citoesqueleto preparado para estabelecer um microambiente entre a célula e o osso, para o qual segregam ácido e enzimas líticas (22) (figura 4).

A dissolução da fase inorgânica do osso precede a degradação da matriz colagénica. A desmineralização do osso envolve a acidificação do microambiente extracelular isolado, um processo mediado por uma bomba de H^+ , a H^+ -adenosina trifosfatase (H^+ -ATPase) vacuolar (22). O meio ácido solubiliza o mineral ósseo; subsequentemente, a matriz orgânica desmineralizada é degradada por acção de várias enzimas líticas, nomeadamente a protease catepsina K e a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). Os produtos da degradação óssea são endocitados pelo osteoclasto, transportados e libertados para o meio extracelular através da superfície celular não reabsortiva (23).

A regulação da osteoclastogénese (diferenciação dos precursores mononucleares em osteoclastos) é modulada pelo factor de estimulação de colónias de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor* – MCSF) e pelo ligando do receptor de activação do factor nuclear κB (NF- κB), RANKL, produzido pelos osteoblastos. Este liga-se ao receptor RANK, da família do factor de necrose tumoral α (*tumour necrosis factor* – TNF), localizado na membrana dos osteoclastos (24, 25). A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína solúvel, produzida pelos osteoblastos, que impede a ligação do RANKL ao

RANK, inibindo assim a osteoclastogénese. De facto, a OPG parece ser um receptor solúvel com alta afinidade para o RANKL, competindo desta forma com o RANK pela ligação ao RANKL (26). É o balanço entre a expressão do estimulador da osteoclastogénese RANKL e do receptor inibitório solúvel OPG, que determina a quantidade de osso reabsorvido (24). Resumindo, a diferenciação dos osteoclastos é, então, principalmente regulada pelo equilíbrio entre os níveis de MCSF, RANKL e OPG. Alterações neste sistema podem conduzir a desequilíbrios na remodelação do osso (27).

A reabsorção óssea é um processo constituído por várias etapas. Inicia-se com o recrutamento de precursores osteoclásticos imaturos, seguido da sua fusão e diferenciação em osteoclastos e, finalmente, da degradação do osso pelas células osteoclásticas maduras. O reconhecimento do osso pelos osteoclastos é controlado por integrinas, nomeadamente, pela integrina $\alpha_v\beta_3$ (receptor da vitronectina) (28). Após a degradação do osso, da qual resulta a formação de uma lacuna de reabsorção, os osteoclastos destacam-se e são substituídos por osteoblastos.

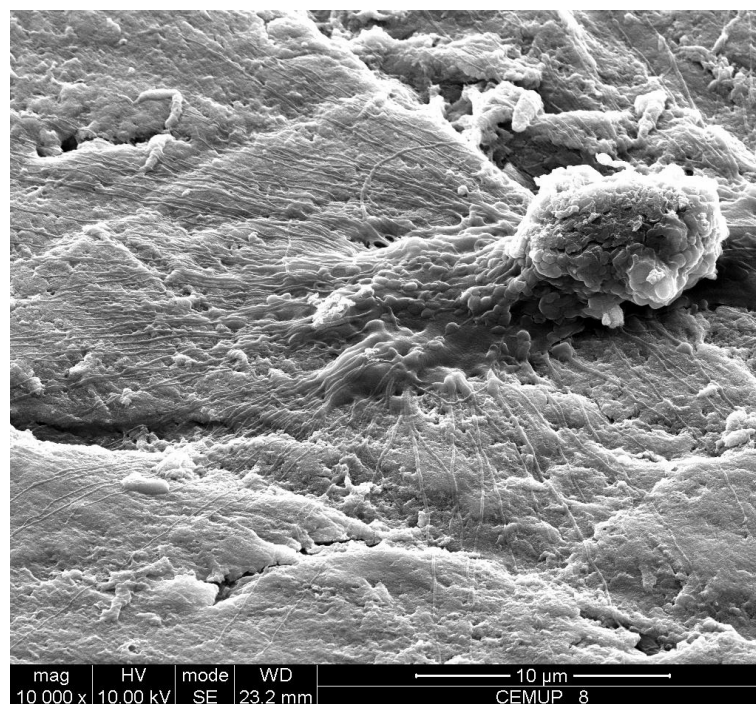


Figura 4. Osteoclasto humano observado por microscopia electrónica de varrimento.

1.1.5 Alterações do metabolismo ósseo

As perturbações do sistema músculo-esquelético são a principal causa de dores crónicas e de incapacidade física (29). Existem várias alterações do metabolismo ósseo, nomeadamente:

- Osteoporose - as propriedades mecânicas do tecido ósseo alteram-se com a idade, porque os mecanismos de remodelação sofrem uma progressiva degradação. Durante o envelhecimento é depositado menos osso do que aquele que é removido, sofrendo este processo uma marcada aceleração após a menopausa (30, 31);
- Osteopetrose – distúrbio do sistema esquelético caracterizado pelo aumento da densidade óssea de forma difusa, tendo como consequência o aumento da sua fragilidade. Esta doença hereditária rara deve-se a disfunção dos osteoclastos (32);
- Doença de Paget - perturbação crónica do esqueleto, na qual algumas zonas do osso crescem de modo anormal e se tornam mais frágeis. Na doença de Paget, os osteoclastos e os osteoblastos tornam-se hiperactivos em algumas áreas do osso, aumentando de maneira significativa a rapidez de renovação do osso. Contudo, estas zonas de renovação acentuada revelam-se mais frágeis do que o osso normal (33);
- Artrose - perturbação crónica das articulações caracterizada pela degenerescência da cartilagem e do osso adjacente. Em muitas situações é necessário recorrer a intervenção cirúrgica para se proceder a uma artroplastia (34).

1.2 Biomateriais

Existem indícios do uso de biomateriais no tratamento de lesões e doenças do corpo humano desde as antigas civilizações egípcia e romana. No entanto, o uso destes materiais aumentou especialmente após 1860, com o advento da cirurgia asséptica por Joseph Lister (35).

Williams, em 1987, definiu biomaterial como “material não viável usado num dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos”. Actualmente, é objectivo de muitos cientistas retirar desta definição as palavras “não viável”. De facto, as expectativas acerca da função dos biomateriais aumentaram, passando de materiais relativamente inertes no corpo para materiais bioactivos que contribuem para a regeneração de tecidos (36).

Inicialmente, a preocupação prioritária na aplicação de materiais no organismo prendia-se com as propriedades físicas dos mesmos (resistência, elasticidade, fadiga, bioestabilidade, permeabilidade). Na década de 80, uma segunda geração de biomateriais, designados de bioactivos, foi desenvolvida de modo a induzirem reacções controladas nos tecidos onde foram implantados. Material bioactivo é então aquele que induz uma resposta biológica específica na interface do material, resultando no estabelecimento de ligações entre os tecidos e o material (37).

Actualmente, os biomateriais são muito diversificados, podendo ser utilizados em diversas partes do corpo humano (figura 4) (36).

O desenvolvimento de novos biomateriais continua a ser uma necessidade constante e extremamente actual, porque, além de não existir um material indicado para todas as aplicações, continuam por esclarecer muitos aspectos relacionados com reacções biológicas e processos de regeneração tecidual.

Devido à complexidade da biologia celular e das reacções das células/tecidos aos biomateriais, é fundamental estudar e tentar copiar a natureza no “design” e fabrico de biomateriais. Este conceito designa-se biomimética (36).

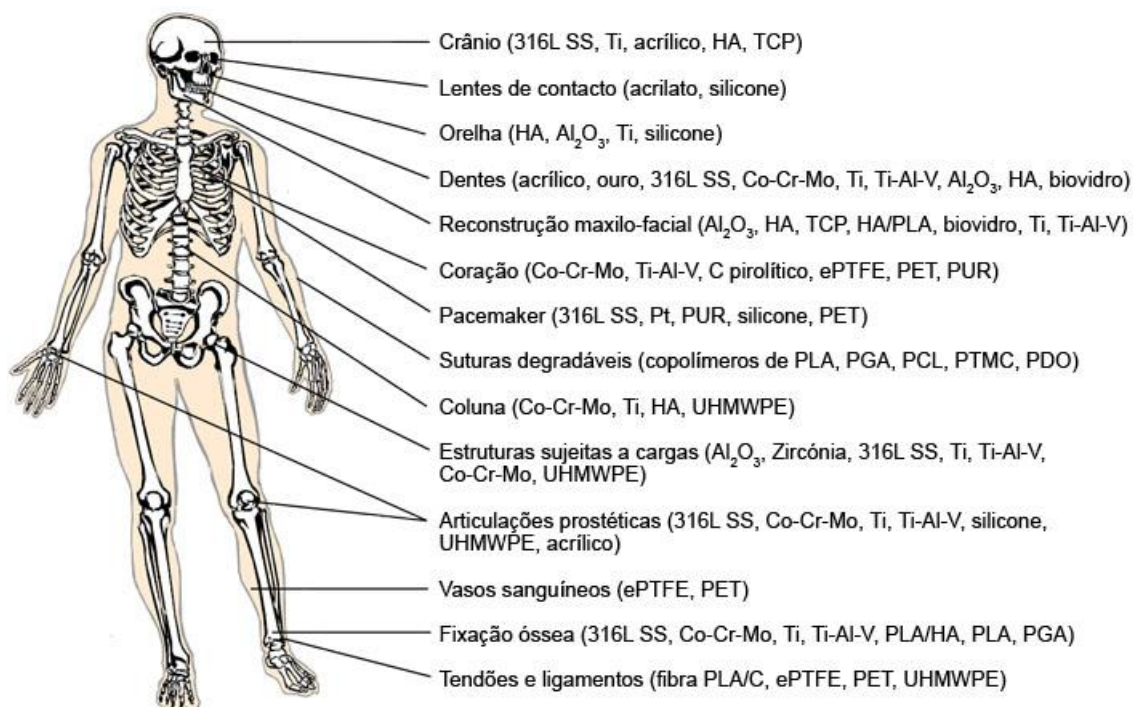


Figura 5. Exemplos de biomateriais e sua distribuição no corpo humano (adaptado de 38).

ePTFE – politetrafluoretileno expandido; HA – hidroxiapatite; PCL – policaprolactona; PDO – poli(p-dioxanona); PET – Poli(tereftalato de etileno); PGA – ácido poliglicólico; PLA – ácido polilático; PTMC – polimetileno carbonato; PUR – poliuretano; SS – aço inoxidável; TCP – trifosfato de cálcio; UHMWPE – polietileno de ultra alto peso molecular.

1.2.1 Classificação

De uma forma geral, os biomateriais podem classificar-se segundo duas vertentes: a sua composição química e o seu comportamento biológico.

A primeira subdivide os biomateriais em 4 classes:

- a) Metais e ligas metálicas;
- b) Cerâmicos;
- c) Polímeros;
- d) Compósitos.

A classificação segundo o comportamento biológico é baseada na resposta do tecido hospedeiro (39):

1. Bioinertes - não provocam reacção de corpo estranho no organismo, encontrando-se em ligação directa ao tecido receptor. Exemplos: titânio, zircónio e alumina.

2. Biotolerados - moderadamente aceites pelo tecido receptor, sendo geralmente envolvidos por uma cápsula fibrosa. Exemplos: aço inoxidável, ligas de cromo-cobalto e o polimetilmetacrilato (PMMA).

3. Bioactivos – permitem o estabelecimento de uma ligação directa aos tecidos vivos, pois geralmente possuem, na sua composição, iões cálcio e/ou fósforo (no caso dos substitutos ósseos), que vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente. Exemplos: hidroxiapatite, vidros bioactivos.

4. Reabsorvíveis - lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados. Exemplos: fosfato tricálcico, vidros bioactivos.

1.2.2 Osteointegração

Existem três elementos essenciais à osteointegração, ou união estável e funcional, entre o osso e o biomaterial: a osteocondução, a osteoindução e a osteogénese. Assim sendo, para ocorrer regeneração tecidular é necessário (39):

- Que as células consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução). Exemplos de materiais osteocondutores: sulfato de cálcio, vidros, materiais à base de fosfato de cálcio (TCP, HA, biocompósitos, cimentos injectáveis) e colagénio;
- A presença de factores que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução). Exemplos de materiais osteoindutores: aloenxerto, matriz óssea desmineralizada (DBM), factores de crescimento ósseo (BMP, TGF- β , PDGF, IGF-I e II, FGF);
- Que as células aderidas e diferenciadas sejam capazes de formar novo tecido ósseo (osteogénese). Exemplos de materiais osteogénicos: osso esponjoso autólogo, aspirado de medula óssea, osso cortical autólogo e osso autólogo vascularizado.

1.2.3 Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos são usados em vários procedimentos cirúrgicos ortopédicos e maxilo-faciais para restabelecer o tecido ósseo que se encontra comprometido devido a doença, trauma ou envelhecimento.

Devem possuir características específicas, consoante a aplicação a que se destinam. Um enxerto ósseo ideal deve preencher um conjunto de requisitos, tais como (40):

- Biocompatibilidade;
- Propriedades mecânicas que lhes permitam resistir a deformações, fractura ou desgaste;
- Permitir reabsorção osteoclástica regulada e uma dissolução a uma velocidade previsível;
- Ser porosos, para permitir transmissões de variações na pressão hidrodinâmica e permitir o crescimento do osso;
- Ser de fácil manuseamento, de baixo custo e fácil e eficazmente introduzidos nos defeitos ósseos.

Os enxertos ósseos podem ser classificados, de acordo com a sua origem, em:

- Autoenxertos – tecido obtido do próprio paciente;
- Aloenxertos – tecido obtido de um dador da mesma espécie;
- Xenoenxertos – tecido obtido de um dador de espécie diferente;
- Enxertos sintéticos – materiais biomiméticos produzidos *in vitro*.

Os autoenxertos são geralmente obtidos do íliaco ou da tíbia e apresentam ótimas propriedades osteogénicas, osteoindutivas e osteocondutoras, pois são obtidos do próprio paciente. A sua utilização apresenta como desvantagens a complexidade da cirurgia, possíveis defeitos estéticos, dor e possíveis sequelas no local de doação, bem como, disponibilidade limitada.

Os alo e xenoenxertos têm como limitações as possíveis transmissões víricas e/ou bacterianas e possibilidade de rejeição imunológica grave. Além disso, durante o seu processamento (congelamento, desmineralização e

esterilização) para futura implantação, podem perder a sua capacidade osteogénica e osteoindutora, comportando-se apenas como osteocondutores.

Actualmente, os enxertos sintéticos são usados em procedimentos ortopédicos, aplicações dentárias e reconstruções maxilo-faciais, devido ao reduzido risco de transmissão de doenças, capacidade de osteocondução, facilidade de utilização e disponibilidade virtualmente ilimitada. Contudo, a nível do comportamento celular, não substituem com sucesso os outros enxertos. Uma possível solução para este problema pode passar pela adição de agentes bioactivos que promovam a actividade celular (39).

1.2.4 Hidroxiapatite reforçada com vidro: Bonelike®

Em 1920, Albee descreveu a primeira reparação óssea bem sucedida com um material composto por fosfato de cálcio (41). Desde então, vários investigadores têm tentado desenvolver materiais à base deste composto (42, 43). No entanto, apenas em 1970 é que a hidroxiapatite (HA) sintética foi aceite como um potencial biomaterial (44).

HA é um fosfato de cálcio inorgânico com fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo também caracterizada pela relação Ca/P de 1,67. A relação Ca/P influencia as características de um material, nomeadamente o grau de solubilidade (45).

A HA sintética possui composição química semelhante à fase mineral do osso, sendo um bom substituto ósseo devido à sua biocompatibilidade e boa osteocondutividade. Contudo, o uso da HA isolada como biomaterial é limitado, devido às suas fracas propriedades mecânicas (44).

Vários investigadores têm desenvolvido novos materiais com o objectivo de melhorar as propriedades mecânicas da HA (46-48). Nesse contexto, Santos *et al.* desenvolveram um novo material composto por HA reforçada com vidro baseado no sistema P_2O_5 -CaO que foi patenteado como Bonelike® (48, 49).

A microestrutura do Bonelike[®] mostrou ter melhores propriedades mecânicas e permitir uma osteointegração mais rápida do que a HA comercial em estudos *in vivo*. Foi também evidenciado que este material não tinha efeitos prejudiciais na estimulação de certos antigénios que desempenham um papel vital na integridade e função do osso e que estimulava o crescimento e diferenciação osteoblástica (50, 51).

1.3 Fitoterapia

A fitoterapia consiste no estudo das plantas medicinais e das suas possíveis aplicações na cura das doenças.

Na realidade, as plantas sempre serviram para tratar o homem, e da sua utilização nasceram a farmacologia e os medicamentos (52). O seu uso surgiu independentemente na maioria dos povos. Por exemplo, na China, surgiu por volta de 3000 a.C., quando o imperador Cho-Chin-Kei descreveu as propriedades do ginseng e da cânfora. As culturas indiana, japonesa, chinesa e muitas outras utilizam diversas fórmulas tradicionais contendo combinações de ervas e especiarias no tratamento da osteoporose.

A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que, actualmente, 4 biliões de pessoas (80 % da população mundial) utilizam medicamentos vegetais para resolver problemas primários de saúde (53).

Os remédios vegetais são, em geral, melhor tolerados quando utilizados globalmente; a associação dos diferentes elementos que os constituem possui propriedades complementares. Neste contexto, poderá haver casos em que as plantas utilizadas integralmente possam ser mais úteis que os medicamentos clássicos, que isolam apenas um princípio activo (52).

Portanto, os efeitos das ervas medicinais provêm das características e concentrações dos seus múltiplos constituintes activos, pelo que a sua análise química e o estudo da sua acção biológica como um todo são essenciais para a compreensão dos efeitos benéficos e despiste de possíveis efeitos tóxicos.

1.3.1 *Equisetum arvense*

Pertencente à família das *Equisetaceae*, a planta *Equisetum arvense* L. (Lineu, 1753) é uma criptogâmica endémica presente em quase todo o mundo (excepto Austrália e Antártida). Em Portugal, é popularmente conhecida como

“cavalinha dos campos” e é considerada uma planta infestante que aparece frequentemente nas bermas de caminhos, pomares e vinhas (54, 55).

Esta planta possui algumas particularidades, das quais se destacam a sua antiguidade, datando do período do Paleozóico, e a sua composição química, em que se destaca o elevado teor de silício, sendo a planta terrestre com maior quantidade deste composto (56, 57).

Além de silício, análises fitoquímicas de extractos hidroalcoólicos de *E. arvense* revelaram a presença de flavonóides (isoquercitina, campferol), esteróis (β -sitosterol, campesterol, isofucoesterol), taninos, saponinas e alcalóides (equispermina, palustina) (58).

Diversos estudos demonstraram a sua actividade anti-inflamatória, hipoglicémica, diurética, hemostática e antioxidante, encontrando-se descritas diversas indicações para o seu uso (interno e/ou externo), entre elas:

- Processos degenerativos da pele, do tecido conjuntivo e dos ossos;
- Rugas e estrias da pele;
- Unhas frágeis ou quebradiças;
- Flacidez mamária;
- Úlceras varicosas, abscessos, feridas infectadas, eczemas e conjuntivites;
- Artroses;
- Osteoporose;
- Raquitismo, fracturas e descalcificação;
- Arteriosclerose;
- Edemas, litíase renal, infecções urinárias e gota;
- Hemorragias.

Investigações sobre o papel do silício no corpo humano revelaram que este oligoelemento se encontra em quantidades ínfimas no organismo, sendo mais abundante na pele, unhas, esmalte dos dentes, cartilagens, ligamentos e ossos. Nestes tecidos, estimula a regeneração das fibras de colagénio e elastina que os formam, e que, com a idade, vão perdendo consistência e elasticidade (59).

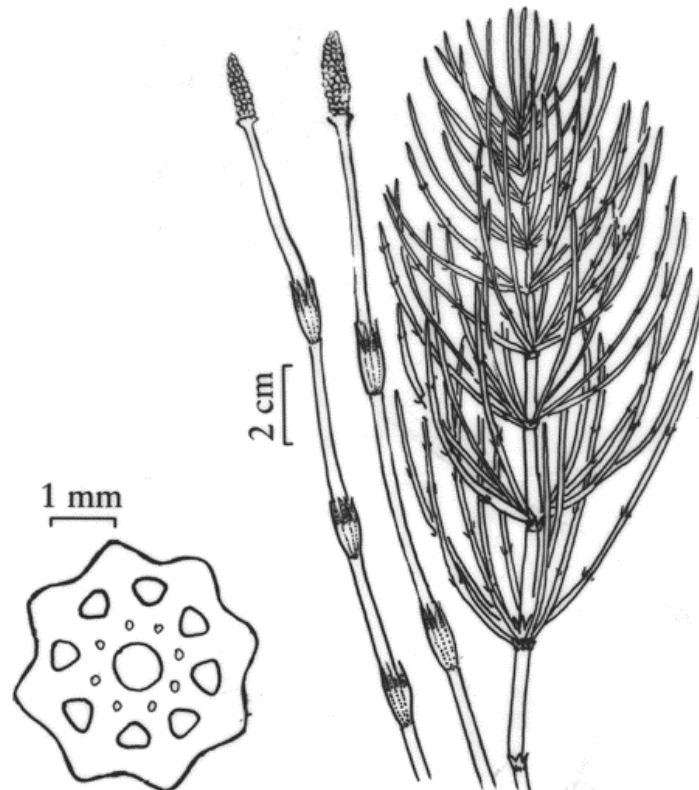


Figura 6. *Equisetum arvense*. Principais características morfológicas e corte transversal (adaptado de 60).

1.3.2 Efeito do silício no metabolismo

Várias hipóteses têm sido levantadas sobre o efeito do silício em diversos processos metabólicos (revisto em 61).

O mecanismo proposto para o papel do silício na arquitectura do tecido conjuntivo está relacionado com a capacidade para actuar como elo de ligação entre cadeias de polissacarídeos e proteínas. O silício também parece estar relacionado com o envelhecimento de alguns tecidos. Por exemplo, foi observado um decréscimo significativo deste ião na aorta e pele humanas ao longo do tempo de vida. Adicionalmente, a diminuição da concentração de silício em paredes arteriais poderá conduzir a aterosclerose (62).

Loeper e Charnot demonstraram que a diminuição da concentração de silício é seguida de acumulação de depósitos lipídicos. De acordo com estes autores, o silício inibe parcialmente a acumulação lipídica, mantém o calibre

normal das fibras elásticas, conserva a integridade dos mucopolissacarídeos e aumenta a impermeabilidade do endotélio para os lípidos (63, 64).

Voronkov *et al.* demonstraram que os ácidos nucleicos contêm silício. No DNA, a cada átomo de silício correspondem 20-30 átomos de fósforo, sendo que no RNA corresponde a 25-45 átomos de fósforo. Este facto realça o papel essencial do silício na estrutura dos ácidos nucleicos e, conseqüentemente, no mecanismo de biossíntese proteica e transmissão hereditária de informação genética (65).

Em relação ao metabolismo ósseo, Schwarz demonstrou, em ratos, que uma dieta pobre em silício atrasa o crescimento e altera o desenvolvimento da estrutura óssea. Segundo este investigador, é provável que o silício desempenhe um papel importante na ligação de estruturas devido à estabilidade da ligação Si-O-Si. Uma das suas mais importantes descobertas foi a identificação da silicase, enzima capaz de remover o ácido silícico. Propôs também uma correlação entre o silício e diversas condições patológicas/fisiológicas, entre as quais, artrite, osteomalácia, osteogénese imperfeita, escleroderma, aterosclerose e cicatrização de feridas (66, 67).

Carlisle demonstrou resultados semelhantes em pintainhos, evidenciando que o silício desempenha um importante papel no processo de mineralização, crescimento e desenvolvimento ósseo, e no metabolismo do tecido conjuntivo em geral. Demonstrou que pintainhos com uma dieta deficiente em silício apresentavam órgãos atrofiados, atraso no desenvolvimento esquelético, perda de flexibilidade nas patas, crânios de menor dimensão e ossos mais achatados (62).

Keeting *et al.* demonstraram que a zeolite A, um mineral que possui silício na sua composição, estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos em cultura. No entanto, uma vez que este material liberta ácido silícico e alumínio, não é possível isolar o efeito do primeiro no processo em causa (68).

Hildebrant *et al.* demonstraram que a expressão de certos genes é activada pelo silício (69), e Reffit *et al.* que, na concentração fisiológica (10-20 μM), o silício estimula a diferenciação osteoblástica, bem como a síntese de colagénio tipo I e de osteocalcina pelos mesmos, estimulando igualmente a actividade da fosfatase alcalina (70).

Resumindo, o silício aparenta desempenhar várias e importantes funções a nível metabólico. No caso do metabolismo ósseo, são diversos os estudos que revelam o efeito estimulatório do silício, suportando a possível vantagem da sua incorporação nos biomateriais destinados a regeneração tecidual (61).

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

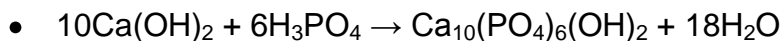
2.1 Preparação do material compósito Bonelike®

Consiste num processo com três etapas distintas:

- Preparação da hidroxiapatite;
- Preparação do vidro;
- Preparação do compósito.

2.1.1 Preparação da hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HA) foi preparada por via química de acordo com a seguinte reacção (ver anexo I):



Recorrendo a uma bomba peristáltica a 150 rpm e homogeneizando através de um misturador eléctrico (R25), adicionou-se a solução aquosa de ácido fosfórico à suspensão aquosa de hidróxido de cálcio.

Ajustou-se o pH a 10.5 adicionando uma solução concentrada de amónia.

Após um período de repouso de 24 horas, a mistura foi filtrada através de um sistema de vácuo e papel de filtro.

Secou-se o material retido numa estufa a 60°C durante 48 horas.

Colocou-se num forno de sinterização (Eurotherm 2408) e realizou-se o seguinte ciclo de aquecimento:

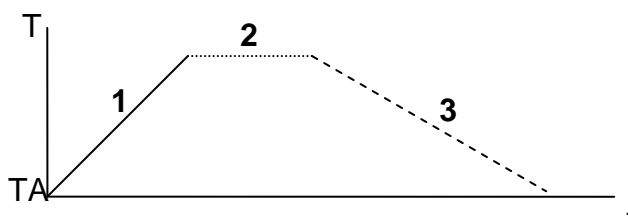


Figura 7. Ciclo de aquecimento da hidroxiapatite.

1) Aquecimento a 4 °C/min; 2) Fase estacionária de 1 hora a 1300 °C; 3) Arrefecimento natural.
T – Temperatura; TA – Temperatura ambiente; t – Tempo.

A HA foi moída num almofariz de ágata e crivada através de um sistema de crivos e peneira eléctrica (Retch Vibratory Sieve Shaker) de modo a se obterem partículas de diâmetro inferior a 75 μm .

2.1.2 Preparação do vidro

Foi preparado um vidro do sistema P_2O_5 -CaO com a seguinte composição (percentagens molares):

- 65% P_2O_5 , 15% CaO, 10% CaF_2 e 10% Na_2O .

Pesaram-se as quantidades apropriadas dos reagentes (carbonato de sódio, hidrogenofosfato de cálcio, pentóxido de fósforo e fluoreto de cálcio) e misturaram-se num cadinho de platina (ver anexo II).

Realizou-se no forno (Shimaden FP21) o seguinte ciclo de fusão:

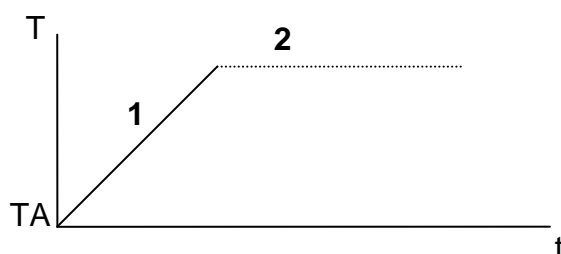


Figura 8. Ciclo de aquecimento do vidro.

1) Aquecimento a 4 ° C/min; 2) Fase estacionária de 2 horas a 1450 °C.
T – Temperatura; TA – Temperatura ambiente; t – Tempo.

Retirou-se e transferiu-se o vidro para um molde metálico onde solidificou.

Moeu-se num almofariz de ágata e crivou-se através de um sistema de crivos e peneira eléctrica (Retch Vibratory Sieve Shaker) de modo a se obterem partículas de tamanho inferior a 75 μm .

2.1.3 Preparação do Bonelike®

O compósito foi preparado misturando, por via seca, 2,5% (massa/massa) de vidro com 97,5% de hidroxiapatite, recorrendo a uma túrbula (WAB Type T2F) durante 2 horas.

Após a mistura de pós e, usando moldes metálicos, obtiveram-se pequenos discos de 16 mm de diâmetro, recorrendo a prensagem uniaxial (200 MPa).

Sinterizaram-se os discos a 1300°C consoante o seguinte ciclo de aquecimento:

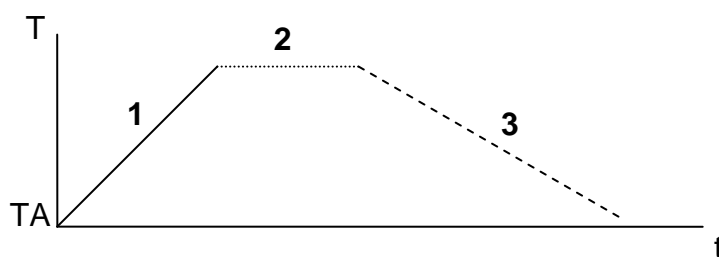


Figura 9. Ciclo de aquecimento do compósito.

1) Aquecimento a 4 ° C/min; 2) Fase estacionária de 1 hora a 1300 °C; 3) Arrefecimento natural.
T – Temperatura; TA – Temperatura ambiente; t – Tempo.

O compósito foi também moído num almofariz de ágata e crivado através de um sistema de crivos e peneira eléctrica (Retch Vibratory Sieve Shaker), de modo a obter-se uma granulometria entre 500 e 600 μm .

2.2 Preparação do extracto hidrometanólico (HM) de *E. arvense*

A *E. arvense* foi adquirida numa ervaária portuguesa sob a forma de partes aéreas secas, grosseiramente fragmentadas e com um peso aproximado de 2 Kg.

As partes aéreas secas foram trituradas de modo a aumentar a eficiência e diminuir a duração da extracção.

A *E. arvense* moída foi introduzida num recipiente lixiviador em vidro e compactada de modo a que as partículas ficassem uniformemente distribuídas e com um aspecto compacto.

Adicionou-se 7,5 L de líquido extractor, solução metanol-água (1:1), de modo a embeber e cobrir totalmente o macerado, que foi deixado em repouso durante 3 dias para permitir a extracção das substâncias para a fase líquida.

O líquido extractor foi recolhido e evaporado (evaporador rotativo a 50°C e pressão reduzida). A recuperação da mistura hidrometanólica foi conseguida por condensação dos vapores num refrigerante de serpentina contendo, como fluído de refrigeração, água a 10°C. O condensado recolhido foi reutilizado como líquido extractor ao adicionar-se novamente ao recipiente lixiviador. Este processo decorreu de modo contínuo durante 10 dias.

Deixou-se o extracto bruto HM secar à temperatura ambiente (TA) durante vários dias até se obter uma massa constante.

Solubilizou-se o extracto HM com dimetilsulfóxido (DMSO) de forma a obter-se uma concentração de 100 mg/mL.

2.3 Actividade osteoblástica do extracto de *E. arvense*

A actividade biológica do extracto HM de *E. arvense* foi avaliada na linha celular MG63 e em células de medula óssea humana.

2.3.1 Culturas celulares

- **Linha celular MG63**

As células MG63 foram cultivadas em *Minimum Essencial Medium, alpha modification*, α -MEM, (GIBCO - Invitrogen), suplementado com:

- soro bovino fetal, 5% (V/V);

- antibióticos: penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml);
- antifúngico: fungizona (2,5 µg/ml);
- ácido ascórbico (50 µg/ml).

As culturas celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera húmida contendo 5% de CO₂.

Para a obtenção de subculturas, removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células aderidas duas vezes com PBS previamente aquecido a 37°C. Seguidamente, adicionou-se 1 ml de uma solução contendo 0,05% (m/V) de tripsina e 0,25% (m/V) de EDTA. Incubou-se a placa durante 5 minutos a 37°C e controlou-se o destacamento das células por visualização microscópica. Para parar a acção da tripsina adicionou-se meio de cultura.

As células foram semeadas a uma densidade celular de 5×10^3 células/cm², tendo sido a contagem do número de células efectuada através de um citómetro (Celltac MEK-5103).

Após uma noite de incubação, adicionaram-se diferentes concentrações de extracto ao meio de cultura (0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg/ml).

O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana e a avaliação das culturas celulares foi efectuada após 1, 3, 6 e 9 dias de contacto com o extracto. O parâmetro avaliado foi a viabilidade/proliferação celular.

• Células de medula óssea humana

As células da medula óssea humana foram cultivadas nas mesmas condições experimentais que foram descritas para a linha celular MG63, exceptuando que o meio de cultura α -MEM foi suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (em vez de 5%).

Após a libertação enzimática (como descrito para a linha celular MG63), as células foram semeadas a uma densidade de 10^4 células/cm².

Após 3 dias de incubação, suplementou-se o meio de cultura com dexametasona (10 nM) e β -glicerofosfato (10 mM). Após mais dois dias de incubação, adicionaram-se diferentes concentrações de extracto ao meio de cultura (0,01; 0,05; 1; 0,5 e 1 mg/ml).

O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana e a avaliação das culturas celulares foi efectuada imediatamente antes da adição dos extractos e após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de contacto com o extracto. Os parâmetros avaliados foram a viabilidade/proliferação celular, a actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP), o conteúdo em proteína total e a presença de depósitos de fosfato.

2.3.2 Caracterização das culturas celulares

- **Avaliação bioquímica**

- Viabilidade/proliferação celular

O ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a viabilidade e proliferação celular nas experiências com culturas celulares.

As culturas foram incubadas com 5mg/mL de MTT, durante 4h a 37°C. Após incubação, o meio de cultura foi removido. Seguidamente, adicionou-se DMSO e a cultura foi colocada em agitação lenta durante 5 minutos.

Efectuou-se a leitura da absorvância a 600 nm num espectrofotómetro ELISA (Denley, modelo Wellscan WS 050).

- Conteúdo em proteína total

O conteúdo em proteína total da camada celular foi quantificado pelo método de Bradford.

Após duas lavagens das culturas celulares com PBS, as células foram solubilizadas com NaOH 0,1M na presença de Triton X-100 0,005% (V/V) durante 1h a 37°C. Posteriormente, as amostras foram diluídas com água destilada e adicionou-se Reagente de Coomassie (*Coomassie[®] Protein Assay Reagent*, Fluka). Após a homogeneização das amostras, a absorvância das mesmas foi quantificada a 600 nm.

- **Actividade da ALP**

A actividade da fosfatase alcalina foi avaliada pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato dissódico pela fosfatase alcalina e determinação do p-nitrofenol formado por espectrofotometria.

Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com tampão PBS e submetidas a lise com triton X-100 a 0,1%. Seguidamente, adicionou-se o substrato (solução de p- nitrofenilfosfato 25 mM em tampão alcalino, pH 10,3) e incubou-se a 37°C durante 60 min. A reacção foi interrompida pela adição de NaOH 5 M. A absorvância foi determinada a 405 nm num leitor ELISA (Denley, Modelo Wellscan WS 050).

- **Avaliação histoquímica**

- **Coloração para a presença de depósitos de fosfato**

Os depósitos de fosfato presentes na matriz foram identificados pelo método de von Kossa (71).

Após fixação (glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,14 M, 10 min), as culturas foram cobertas com uma solução de nitrato de prata a 1% e submetidas a radiação UV durante 1 h (lâmpada UV, VILBER LOURMAT, modelo VL 4L). Depois de lavadas com água destilada, foram recobertas com uma solução de tiosulfato de sódio a 5%, durante 2 min, sendo novamente lavadas com água destilada.

2.4 Actividade antibacteriana do extracto de *E. arvense*

Utilizaram-se culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Preparou-se uma suspensão desta estirpe em soro fisiológico com turvação 0,5 MacFarland (Densimat, Biomérieux).

Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, tendo sido testadas as concentrações de 0,01 0,05 0,1 0,5 e 1 mg/ml do extracto de *E. arvense* (em meio Mueller-Hinton).

As diferentes concentrações dos extractos foram colocadas nos respectivos poços e, seguidamente, adicionaram-se 5 µL/poço da suspensão bacteriana. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Findo este tempo, mediu-se a absorvância das placas a 600 nm.

2.5 Impregnação do Bonelike[®] com o extracto de *E. arvense*

A fim de se otimizar o processo de impregnação dos grânulos de Bonelike[®] com o extracto, foram testadas várias condições experimentais, nas quais se variou a concentração de extracto, o solvente de impregnação e o tempo de impregnação. Testou-se as concentrações de 2,5 mg/ml e 5 mg/ml de extracto em dois solventes diferentes, PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e etanol, perfazendo um total de 4 condições. Para todas as soluções de impregnação, foram efectuados controlos negativos, nos quais o extracto de *E. arvense* foi substituído por DMSO (dimetilsulfóxido). Os tempos de impregnação testados foram 5 minutos, 1 hora e 1 dia.

Primeiramente, pesaram-se os grânulos de Bonelike[®] em placas de cultura de 96 poços (0,04 g/poço). Nas experiências de biocompatibilidade, esterilizaram-se as amostras através de radiação ultravioleta (UV). Após adição de 120 µL/poço de solução de impregnação, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (TA), durante os períodos de tempo referidos anteriormente. Seguidamente, removeu-se a solução não impregnada e transferiram-se os grânulos, depois de secos à TA, para nova placa.

Extraiu-se o extracto impregnado nos grânulos através de duas lavagens com uma solução de metanol:água (1:1) e analisaram-se as amostras obtidas através de espectroscopia UV ($\lambda = 254$ nm).

2.5.1 Estudos de libertação do extracto em PBS

De forma a tentar obter-se uma perspectiva da cinética de libertação do extracto impregnado nos grânulos, procedeu-se à análise do processo em 3 tempos diferentes (5 minutos, 1 hora e 1 dia).

Após impregnação dos grânulos com extracto, adicionou-se a cada poço 120 µL de PBS e incubou-se a 37°C durante os períodos de tempo atrás referidos.

Seguidamente, procedeu-se à análise da cinética de libertação do extracto através da quantificação do extracto libertado para o PBS por espectroscopia UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

2.6 Actividade osteoblástica do Bonelike[®]/E. arvense

A actividade biológica do Bonelike[®] associado ao extracto HM de *E. arvense* foi avaliada na linha celular MG63.

As células MG63 foram cultivadas nas mesmas condições experimentais que foram descritas anteriormente.

Após a libertação enzimática, as células foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células/cm².

A suspensão celular foi adicionada sobre 4 tipos de grânulos de Bonelike[®] (previamente impregnados com o extracto de *E. arvense*). O volume final de meio de cultura utilizado foi de 120 e 220 µl para os grânulos que foram impregnados, utilizando, respectivamente, PBS e etanol como solventes de impregnação.

O meio de cultura não foi renovado e a avaliação das culturas celulares foi efectuada nos dias de cultura 1, 4 e 7. O parâmetro avaliado foi a viabilidade/proliferação celular.

3. RESULTADOS

3.1 Análise física da hidroxiapatite e do Bonelike®

As amostras preparadas de HA e Bonelike® foram submetidas a análise física por Difrração de Raios-X (DRX).

A análise do espectro de DRX da HA preparada laboratorialmente (figura 10) revela que todos os picos correspondem aos valores padrão (ver anexo III), sendo portanto de fase pura.

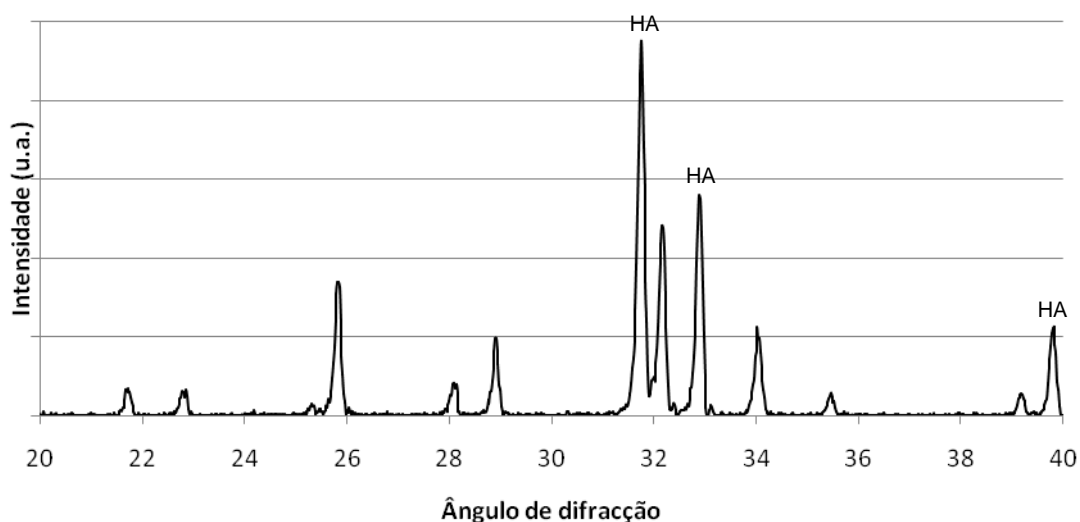


Figura 10. Espectro de DRX da hidroxiapatite.

A análise do espectro de DRX do Bonelike® preparado laboratorialmente (figura 11) permite verificar a presença de picos correspondentes às fases α -TCP e β -TCP, mantendo-se a presença dos picos característicos da HA (conforme fichas de DRX, anexo III).

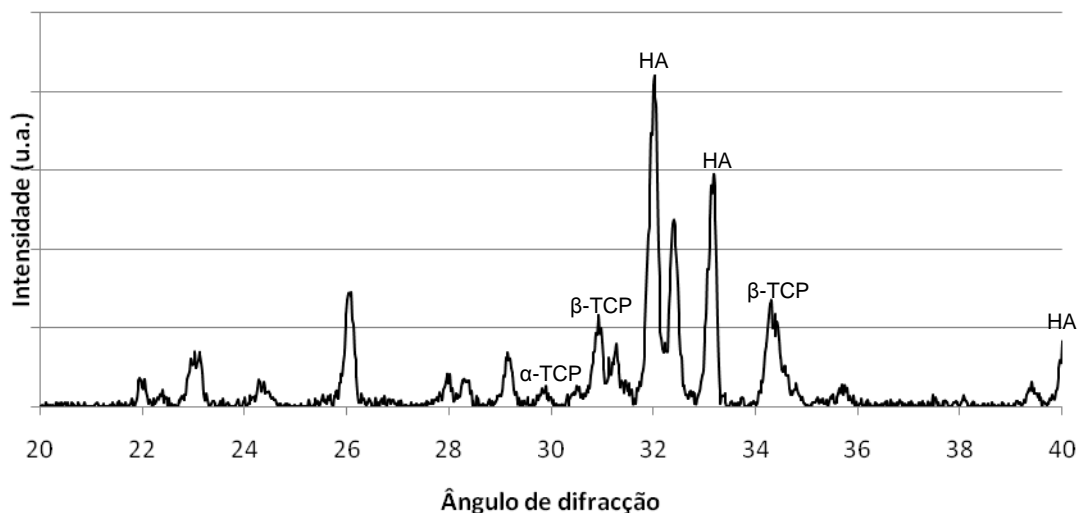


Figura 11. Espectro de DRX do Bonelike®.

3.2 Actividade biológica do extracto de *E. arvense*

3.2.1 Efeito na proliferação e diferenciação osteoblástica

Para se determinar se o extracto de *E. arvense* apresentava um efeito osteogénico, avaliou-se a sua actividade biológica na linha celular MG63 e em células de medula óssea humana.

Para tal, as células foram cultivadas na ausência ou presença de diferentes concentrações de extracto (ou DMSO nos controlos negativos), tendo-se avaliado o comportamento das culturas celulares em função do tempo. Foram efectuadas 6 réplicas nos ensaios quantitativos e 3 réplicas nos ensaios qualitativos.

- **Linha celular MG63**

Neste trabalho, pretendeu-se analisar de que forma o extracto de *E. arvense* afectava a viabilidade/proliferação da linha celular MG63, após 1, 3, 6

e 9 dias da adição do mesmo. Esta análise foi efectuada através do ensaio do MTT, que avalia a capacidade das células viáveis reduzirem sais tetrazólicos, devido à actividade da desidrogenase mitocondrial. As concentrações de extracto analisadas foram: 0,05; 0,1; 0,5; 1 mg/ml (figura 12).

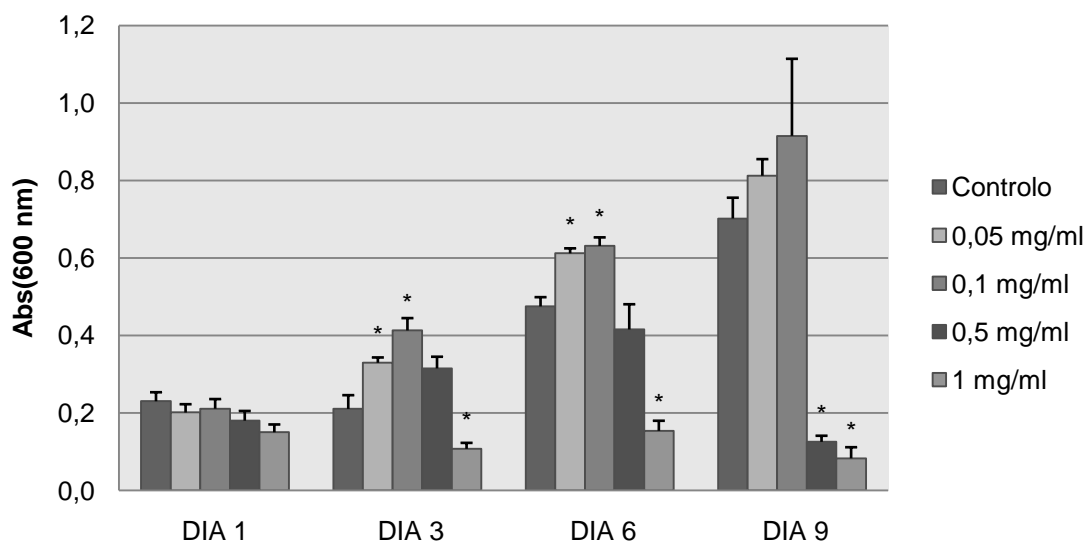


Figura 12. Viabilidade/proliferação da linha celular MG63 na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes do extracto de *E. arvense*.

* Significativamente diferente da situação controlo.

Após análise dos resultados, verifica-se um efeito estimulatório da proliferação/viabilidade celular para concentrações de extracto de 0,05 e 0,1mg/ml. Este efeito é notório a partir do dia 3 e estende-se até ao final da experiência. Para valores iguais ou superiores a 0,5mg/ml o extracto revelou-se prejudicial à proliferação/viabilidade celular.

- **Células da medula óssea humana**

Seguidamente, efectuou-se um estudo semelhante, utilizando células de medula óssea humana em vez da linha celular MG63. As culturas celulares foram suplementadas com dexametasona e β -glicerofosfato de sódio, uma vez que estas moléculas favorecem a diferenciação osteoblástica e estimulam o processo de mineralização (72). As concentrações de extracto analisadas foram 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 mg/mL. As culturas celulares foram analisadas

imediatamente antes da adição do extracto e após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de contacto com o mesmo.

Um dos parâmetros avaliados foi a viabilidade/proliferação celular através do ensaio do MTT (figura 13).

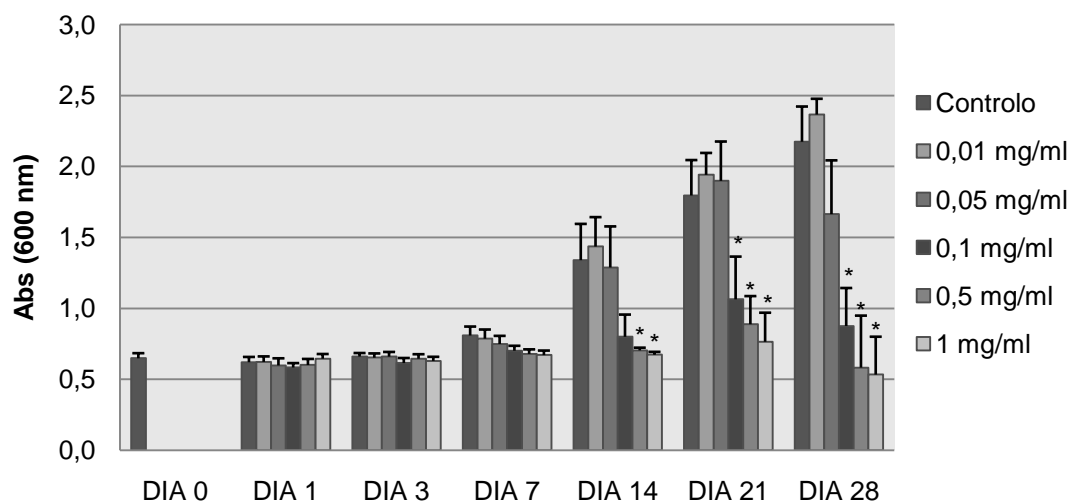


Figura 13. Proliferação das células da medula óssea humana na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes do extracto de *E. arvense*.

* Significativamente diferente da situação controlo.

Após análise dos resultados constata-se que, ao contrário do verificado com a linha celular MG63, as células de medula óssea humana não apresentam um aumento significativo na sua viabilidade/proliferação em resposta à presença do extracto. No entanto, mais uma vez se verificou que concentrações elevadas do mesmo aparentam ser prejudiciais para as culturas celulares. É de salientar igualmente que, na fase final da cultura celular (dias 21 e 28), a concentração de extracto de 0,1 mg/ml revelou-se inibitória da viabilidade/ proliferação celular.

Com o objectivo de se avaliar o efeito do extracto de *E. arvense* na diferenciação osteoblástica, determinou-se a actividade da fosfatase alcalina (ALP) presente nas culturas celulares. Para tal, esta actividade foi normalizada em relação ao conteúdo em proteína total (prot.) através da relação ALP/prot (figura 14). Desta forma garante-se que, se existir um aumento na razão

ALP/prot., este pode ser uma consequência da presença de uma maior proporção de células osteoblásticas diferenciadas, ou de um aumento da quantidade de ALP produzida pelas mesmas.

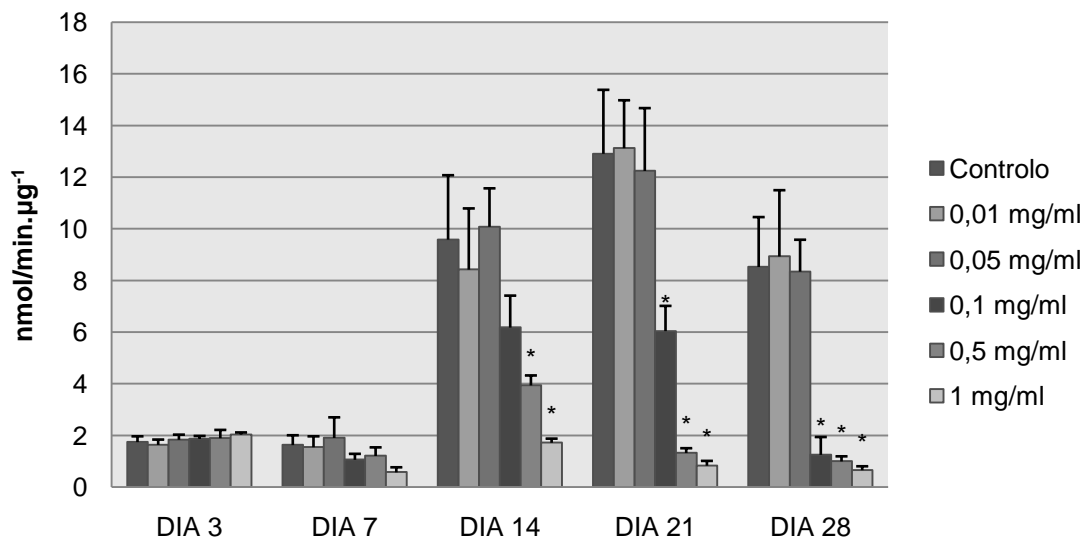


Figura 14. Actividade da ALP na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes do extracto de *E. arvense*.

* Significativamente diferente da situação controlo.

Após análise dos resultados, verifica-se que não existe um efeito significativo do extracto de *E. arvense* na estimulação da actividade da ALP. Novamente, concentrações mais elevadas de extracto (iguais ou superiores a 0,5 mg/ml) aparentam ter um efeito inibitório no parâmetro avaliado, sendo que, a partir do dia 21, esse efeito é igualmente observado para a concentração de 0,1 mg/ml.

Foi também estudado o efeito do extracto de *E. arvense* no processo de mineralização das culturas celulares, através da análise da presença de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular pela coloração de von Kossa (figura 15). Neste método, os depósitos de fosfato de cálcio dão origem a fosfato de prata por reacção com o nitrato de prata, que é posteriormente reduzido pela radiação UV, com formação de prata metálica. A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos negros na camada celular.

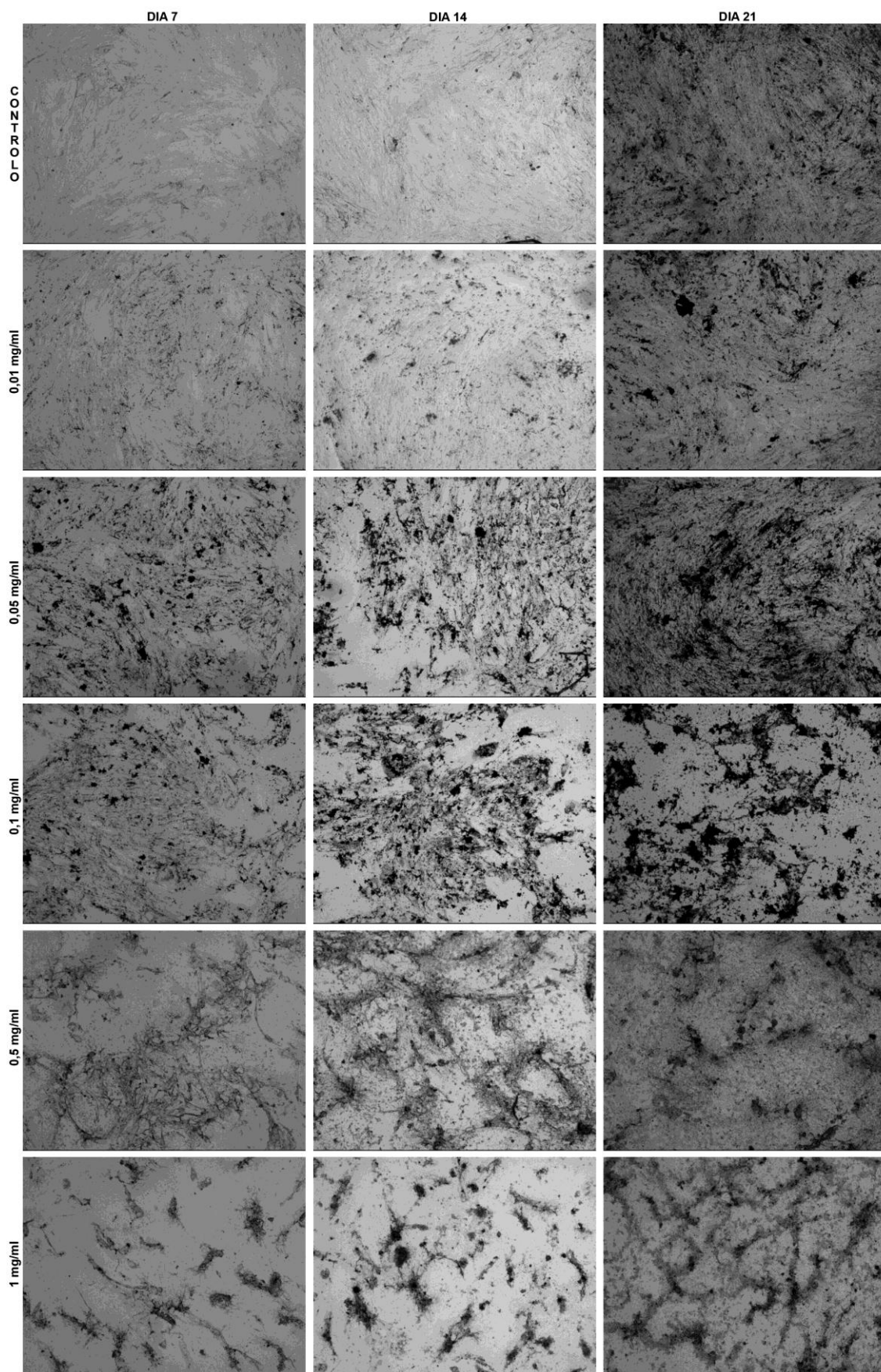


Figura 15. Imagens de culturas celulares de medula óssea humana cultivadas na ausência (Controlo) ou presença de quantidades crescentes de extracto de *E. arvense*, coradas pelo método de von Kossa (ampliação 50 x).

Após análise dos resultados, constatou-se que o extracto de *E. arvense* estimula claramente a deposição de fosfatos. Este efeito é observável a partir do dia 7, sendo mais acentuado para concentrações de 0,05 e 0,1 mg/ml. Em menor extensão, também é observado na concentração de 0,01 mg/mL. Por outro lado, na condição onde não se adicionou extracto de *E. arvense* (situação Controlo), a deposição de fosfatos só foi observada a partir do dia 21. Verificou-se mais uma vez um efeito prejudicial do extracto nas culturas celulares, para concentrações iguais ou superiores a 0,5 mg/mL.

3.2.2 Efeito antibacteriano

Com o objectivo de se estudar o efeito antibacteriano do extracto de *E. arvense*, avaliou-se a resposta duma suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* a concentrações crescentes do extracto.

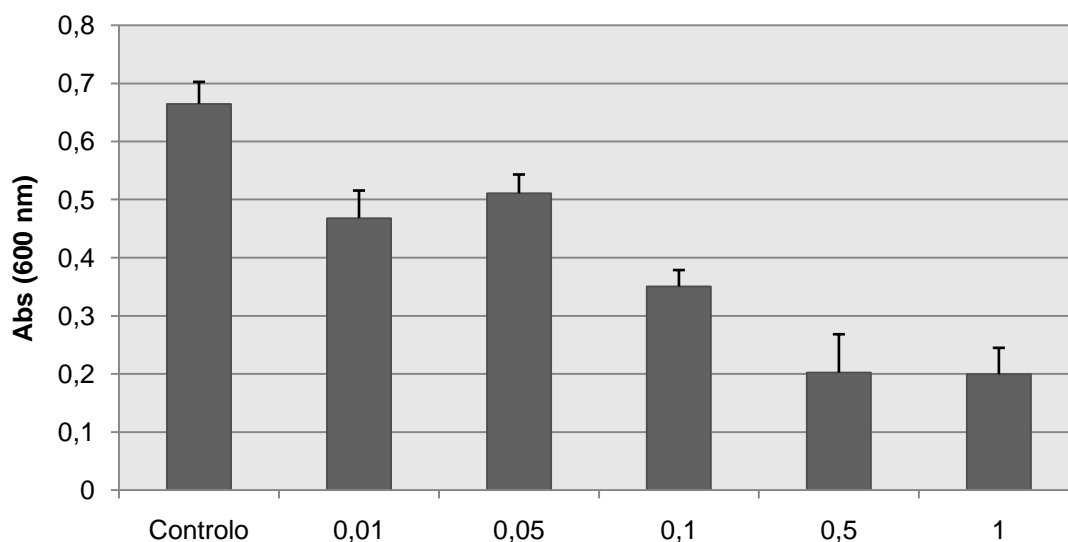


Figura 16. Crescimento de *Staphylococcus aureus* na ausência (Controlo) ou presença de diferentes concentrações do extracto de *E. arvense*.

* Significativamente diferente da situação controlo.

Após análise dos resultados, constatou-se que o extracto de *E. arvense* apresenta propriedades antimicrobianas significativas. De facto, verificou-se

uma diminuição de 30% no crescimento do *S. aureus* para a concentração de extracto mais baixa (0,01 mg/ml) em teste, sendo esta inibição mais acentuada nas culturas efectuadas com concentrações mais elevadas.

3.3 Sistema Bonelike[®]/*E. arvense*

Tendo em conta os resultados obtidos acerca da actividade biológica do extracto de *E. arvense* foi possível definir qual a gama de concentrações de extracto com actividade osteogénica e antimicrobiana. Com base nesses valores, procurou associar-se o extracto de *E. arvense* ao Bonelike[®] (sistema Bonelike[®]/*E. arvense*) de modo a que o biomaterial libertasse para o meio de cultura uma quantidade de extracto compatível com a gama de concentrações previamente definida. Para tal, e uma vez que nunca se tinha tentado impregnar grânulos de Bonelike[®] com extracto de *E. arvense*, foram realizados vários estudos nos quais se variou o tempo de impregnação, a concentração do extracto e o tipo de solvente de impregnação, bem como testes de libertação do extracto em PBS a 37 °C para simulação do ambiente fisiológico.

3.3.1 Associação do Bonelike[®] com o extracto de *E. arvense*

Testaram-se concentrações de 2,5 mg/ml e 5 mg/ml de extracto em dois solventes diferentes, PBS e etanol, perfazendo um total de 4 condições (tabela 1). Paralelamente foram efectuados controlos negativos, nos quais se substituiu o extracto de *E. arvense* por DMSO.

Tabela 1. Soluções de impregnação testadas.

		Solvente	
		Etanol	PBS
Concentração (mg/ml)	2,5	A1	A2
	5	B1	B2

Após vários testes preliminares, determinou-se que o tempo de impregnação mais eficiente era 1 dia, pois permitia que uma maior quantidade de extracto ficasse efectivamente associada aos grânulos.

Seguidamente, procurou obter-se informação acerca da cinética de libertação do extracto associado ao Bonelike[®], em PBS, a 37°C. Foram analisados 3 tempos de incubação com PBS diferentes – 5', 1h e 1 dia. Nestes estudos foi incluída uma situação controlo na qual, após impregnação dos grânulos com as diferentes soluções de extracto durante 1 dia, procedeu-se a duas lavagens dos mesmos com uma solução de metanol:água (1:1) para se extrair o extracto. Todas as amostras obtidas foram analisadas por espectroscopia UV, a 254 nm (tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de extracto (mg/dl) libertado para o PBS (λ = 254 nm)

Soluções de impregnação*	Controlo	5'	1h	1 dia
A1	0,451 \pm 0,046	0,384 \pm 0,043	0,422 \pm 0,032	0,402 \pm 0,045
A2	0,140 \pm 0,015	0,101 \pm 0,005	0,069 \pm 0,012	0,137 \pm 0,018
B1	1,541 \pm 0,110	0,864 \pm 0,097	0,887 \pm 0,076	0,926 \pm 0,081
B2	0,319 \pm 0,061	0,275 \pm 0,031	0,330 \pm 0,033	0,420 \pm 0,054

*Composição das soluções de impregnação previamente descrita na tabela 1

Após análise dos resultados verifica-se que os testes de libertação do extracto em PBS revelaram uma rápida cinética do processo para os dois solventes de impregnação utilizados. De facto, constata-se que, em ambas as situações, após 5 minutos de incubação em PBS ocorreu uma libertação de mais de 50% do extracto (em comparação com o controlo). No entanto, a cinética da libertação do extracto utilizando o PBS como solvente de impregnação aparenta ser mais lenta do que a que se verifica quando se utiliza o etanol como solvente de impregnação.

3.3.2 Actividade osteoblástica do sistema Bonelike®/*E. arvense*

Finalmente, e com base nos resultados previamente apresentados, efectuou-se uma avaliação da actividade osteoblástica do sistema Bonelike®/*E. arvense* na linha celular MG63.

Para tal, e com base nas experiências descritas na secção 3.3.1, procedeu-se à impregnação do Bonelike® com soluções de extracto de *E. arvense* a 2,5 mg/ml, utilizando etanol ou PBS como solvente. Foram igualmente incluídas neste estudo situações controlo nas quais se substituiu o extracto por DMSO.

Uma vez que o etanol, como solvente de impregnação, permite uma maior associação do extracto ao Bonelike® (ver tabela 2), e, consequentemente, uma libertação de uma maior quantidade do mesmo, o volume final de meio de cultura utilizado foi de 120 e 220 µl para os grânulos que foram impregnados, utilizando, respectivamente, PBS e etanol, como solventes de impregnação. Desta forma, pretendeu-se que a concentração de extracto no meio de cultura fosse a mais próxima possível em ambas as condições experimentais.

O parâmetro avaliado foi a viabilidade/proliferação celular através do ensaio do MTT. Foram analisadas duas situações de cultura diferentes, que variaram na não realização (figura 17), ou realização (figura 18) de uma pré-incubação do sistema Bonelike®/*E. arvense* com o meio de cultura. Foram efectuadas 3 réplicas para cada condição testada.

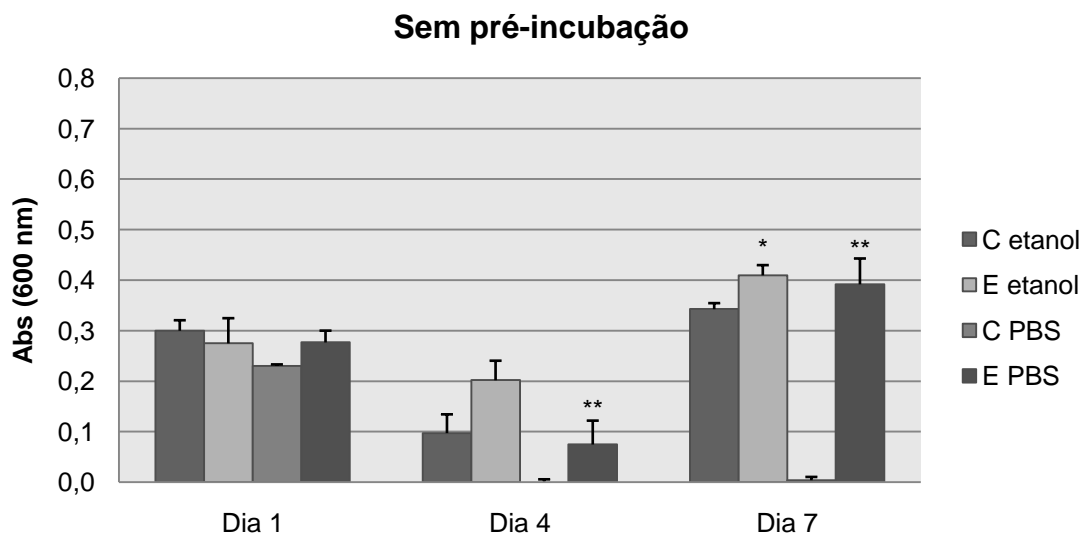


Figura 17. Viabilidade/proliferação da linha celular MG63 em contacto com o sistema Bonelike[®]/*E. arvense* (E) e Bonelike[®]/DMSO (C) (sem pré-incubação).

* Significativamente diferente da situação controlo (etanol). ** Significativamente diferente da situação controlo (PBS).

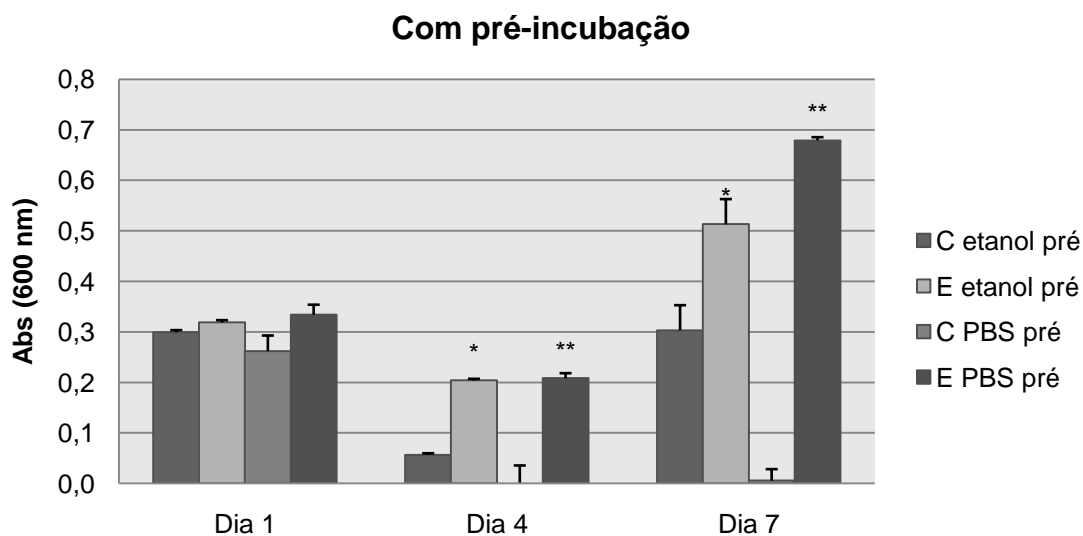


Figura 18 Viabilidade/proliferação da linha celular MG63 em contacto com o sistema Bonelike[®]/*E. arvense* (E) e Bonelike[®]/DMSO (C) (com pré-incubação).

* Significativamente diferente da situação controlo (etanol). ** Significativamente diferente da situação controlo (PBS).

Após análise dos resultados, verifica-se que a condição mais favorável à viabilidade/proliferação celular foi o sistema Bonelike[®]/*E. arvense* (utilizando PBS como solvente de impregnação) e após pré-incubação. De uma forma geral, é evidente a diferença de comportamento das culturas celulares na

ausência ou presença do extracto de *E. arvense* associado ao Bonelike[®], revelando um claro efeito estimulatório do mesmo no parâmetro avaliado. Esta diferença foi observada para ambos os solventes de impregnação analisados. No entanto, foi mais notória nas condições de impregnação do extracto em PBS. Observou-se também que a pré-incubação do sistema Bonelike[®]/*E. arvense* com meio de cultura revelou ser vantajosa quando a impregnação foi efectuada em PBS, não havendo diferenças significativas na situação em que a impregnação do biomaterial foi efectuada em etanol.

4. DISCUSSÃO

A análise do espectro de DRX da HA, preparada laboratorialmente, revela que todos os picos correspondem aos valores padrão para esta fase pura, podendo, portanto, ser usada na preparação do Bonelike[®].

Por outro lado, a análise do espectro de DRX do Bonelike[®], preparado laboratorialmente, permite verificar a presença de picos correspondentes a 3 fases (HA, β -TCP e α -TCP), correspondendo ao espectro característico do Bonelike[®]. Como demonstrado anteriormente (73), o biovidro reage com a HA durante o processo de sinterização e decompõe-na parcialmente em α -TCP e β -TCP. Estas fases são mais solúveis que a HA, e a sua dispersão na matriz de HA é um factor importante que contribui para a melhoria das suas propriedades mecânicas e biológicas (73). A distribuição homogénea de α -TCP, β -TCP e HA na microestrutura do Bonelike[®] é o factor determinante na elevada osteocondução que este material compósito apresenta.

Existem diversas gamas de tamanhos de grânulos de Bonelike[®], sendo que, usualmente, as maiores são utilizadas para regeneração óssea em ortopedia e as de menores dimensões, em cirurgias maxilo-faciais. Neste trabalho, optou-se pela utilização de Bonelike[®] com granulometria entre 500 e 600 μ m (uma das utilizadas na área de ortopedia) uma vez que, em testes iniciais com grânulos de menores dimensões, surgiram dificuldades relacionadas com interacções electrostáticas. Deste modo, foi também possível garantir a utilização da mesma quantidade de material durante o procedimento experimental.

Preparações de *E. arvense* são, há muito tempo, utilizadas na terapêutica de suporte para a osteoporose e para a promoção da cicatrização óssea após cirurgia ou fractura, com um historial de resultados bem sucedidos (74, 75). A *E. arvense* é também conhecida pelas suas propriedades antissépticas com um largo espectro de actividade antimicrobiana (76).

Numa primeira fase do trabalho, pretendeu-se avaliar qual o efeito de um extracto hidrometanólico de *E. arvense* na viabilidade/proliferação celular de

culturas da linha celular MG63, tendo-se verificado uma estimulação do mesmo para concentrações de extracto de 0,05 e 0,1 mg/ml.

O efeito osteogénico do extracto de *E. arvense* foi também avaliado em culturas de células de medula óssea humana, através da avaliação da viabilidade/proliferação celular, determinação da actividade da fosfatase alcalina e da presença de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular pelo método de von Kossa. Estes últimos dois parâmetros não foram analisados na linha celular MG63, uma vez que estas células, apesar de serem da linhagem osteoblástica, derivam de osteosarcoma humano, encontrando-se ainda numa fase pouco diferenciada. Como tal, não mineralizam e produzem quantidades reduzidas de fosfatase alcalina, um dos marcadores bioquímicos característicos dos osteoblastos (77).

Ao contrário do observado nas culturas da linha celular MG63, não se verificou nenhum efeito estimulatório significativo do extracto de *E. arvense* na viabilidade/proliferação celular. Tal facto sugeriu que, a haver algum efeito osteogénico por parte do extracto, este poderia estar relacionado com uma estimulação da diferenciação celular, havendo dessa forma um menor efeito sobre a proliferação das células. É de destacar, no entanto, que, independentemente do tipo celular utilizado, para valores de concentração de extracto iguais ou superiores a 0,5 mg/ml, se obteve um efeito inibitório da viabilidade/proliferação celular.

Em relação aos parâmetros funcionais analisados nas culturas de células de medula óssea humana, constata-se que, por um lado, não houve uma estimulação aparente na expressão de fosfatase alcalina. No entanto, o extracto de *E. arvense* revelou possuir um efeito estimulatório na diferenciação osteoblástica, uma vez que promoveu um claro aumento da deposição mineral na matriz extracelular. Este aumento foi particularmente notório nas culturas celulares efectuadas na presença de concentrações de extracto de 0,05 e 0,1 mg/mL.

A *E. arvense* contém vários compostos fenólicos (74, 78, 79) que poderão desempenhar um papel na estimulação da viabilidade/proliferação observada. Uma associação positiva entre estes compostos e o metabolismo ósseo, baseados em experiências de culturas celulares, modelos animais e estudos clínicos, foi relatada em duas recentes revisões (80, 81). A *E. arvense*

acumula fenóis, principalmente os flavonóis quercitina e campferol, e a flavona apigenina, entre outros (79). Estudos em culturas de osteoblastos demonstraram um aumento da actividade da fosfatase alcalina e da mineralização óssea na presença destas duas moléculas (82), tendo alguns autores sugerido o envolvimento da ERK e activação do receptor de estrogénio (83). Também foi descrita a influência da apigenina no comportamento celular ósseo, mas o seu efeito no osso ainda não está completamente esclarecido (80, 84). Adicionalmente, o elevado teor em silício da *E. arvense* (56, 58) pode também ter influenciado a resposta biológica das culturas celulares à presença do extracto. De facto, sabe-se que o silício é um oligoelemento envolvido em inúmeros processos metabólicos, entre os quais o metabolismo ósseo (59). Dessa forma, a presença de silício, proveniente do extracto de *E. arvense*, no meio de cultura pode ter estimulado a actividade osteoblástica das culturas celulares.

Resumindo, ficou demonstrado que o extracto de *E. arvense* apresenta propriedades osteogénicas, quer em culturas da linha celular MG63, quer em culturas de células de medula óssea humana. É importante destacar também que a gama de concentrações de extracto com efeito estimulatório nos parâmetros avaliados se situa entre as 0,05 e as 0,1 mg/ml para os dois tipos celulares estudados.

Simultaneamente, foi também analisada a actividade antimicrobiana do extracto de *E. arvense*. Verificou-se que o *S. aureus* foi sensível à presença do extracto, tendo o mesmo provocado uma inibição no crescimento bacteriano proporcional à sua quantidade. Tal facto parece estar novamente relacionado com o elevado conteúdo de compostos fenólicos (76) e os resultados obtidos estão em concordância com estudos realizados com o seu óleo essencial (85). A actividade antibacteriana é relevante se considerarmos que as infecções ósseas são especialmente causadas por bactérias Gram positivas (86) e *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva patogénica comum nas infecções relacionadas com biomateriais (86, 87). De facto, após a implantação, o biomaterial rapidamente adquire uma camada de proteínas, tais como, colagénio, fibrinogénio e fibronectina, o que proporciona um substrato favorável a colonização bacteriana, que, no caso do *S. aureus*, é mediado por moléculas de adesão específicas (MSCRAMMs, *microbial surface components*

recognizing adhesive matrix molecules) (87). A colonização bacteriana impede a adesão celular, o que reduz a resposta do tecido hospedeiro porque dificulta o processo de regeneração (86).

Resumindo, é importante realçar que, para concentrações de extracto de *E. arvense* de 0,05 e 0,1 mg/ml, se observam, não só efeitos osteogénicos acentuados, como também efeitos antimicrobianos contra *S. aureus*. Esta dupla acção faz com que o extracto *E. arvense* revele um perfil com elevado potencial para utilização em estratégias de regeneração óssea. De facto, a presença, no ambiente ósseo, de um agente ambivalente, com propriedades osteogénicas e antibacterianas, favorece a adesão celular e a actividade osteoblástica enquanto previne o risco de infecção.

Seguidamente, efectuou-se a impregnação de grânulos de Bonelike® com extracto de *E. arvense*, de forma a libertarem para o meio de cultura uma quantidade de extracto estimulatória da proliferação e diferenciação osteoblástica. Após optimização das condições de impregnação, efectuou-se um estudo com culturas da linha celular MG63 para avaliar se o sistema Bonelike®/*E. arvense* estimulava a viabilidade/proliferação celular. Neste estudo, avaliou-se igualmente se uma pré-incubação dos grânulos com meio de cultura afectava os resultados. Esta pré-incubação teve como objectivo criar um ambiente à superfície dos grânulos mais propício à adesão celular, uma vez que haveria um equilíbrio prévio do biomaterial com os componentes do meio de cultura. Após análise dos resultados, verifica-se que a pré-incubação aparenta ser vantajosa, uma vez que, de uma maneira geral, os valores obtidos no ensaio do MTT são superiores nessa condição, quando comparados com as culturas celulares efectuadas na ausência da pré-incubação.

Adicionalmente, demonstrou-se que o sistema Bonelike®/*E. arvense* estimula a viabilidade/proliferação celular, e que este efeito é mais acentuado quando se utiliza o PBS como solvente de impregnação. Neste caso, de facto, a diferença entre a situação controlo (utilização de DMSO em vez de extracto) e o sistema Bonelike®/*E. arvense* é marcadamente acentuada.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho efectuado no âmbito desta tese teve por base um conhecimento, que, apesar de empírico, é já milenar, acerca das propriedades medicinais da *Equisetum arvense*. Numa época em que se tenta, de certa forma, regressar à fitoterapia, pretendeu-se estudar as propriedades osteogénicas de um extracto desta planta em associação com o Bonelike®. Uma vez que a *E. arvense* é uma planta muito abundante, e, consequentemente, de muito baixo custo, a sua utilização num contexto clínico é economicamente muito aliciante.

Numa primeira fase, pretendeu-se avaliar a actividade biológica do extracto de *E. arvense*. De uma maneira geral, verifica-se que a gama de concentrações de extracto necessária para um efeito indutor da proliferação e diferenciação osteoblástica se encontra entre 0,05 e 0,1 mg/ml. É de salientar que, do ponto de vista funcional, as culturas de osteoblastos cultivadas na presença destas concentrações de extracto apresentaram uma mineralização mais acentuada e bastante mais precoce, relativamente à situação controlo. No entanto, verificou-se igualmente que o extracto apresenta efeitos prejudiciais/inibitórios para valores de concentração de extracto iguais ou superiores a 0,5 mg/ml. Simultaneamente, nessas mesmas concentrações, demonstrou-se a sua actividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Uma vez analisada a actividade biológica do extracto de *E. arvense*, procedeu-se à sua associação com grânulos de Bonelike® e posterior utilização em culturas da linha celular MG63. Após análise dos resultados, conclui-se que, de facto, quando se procede à impregnação dos grânulos utilizando PBS como solvente de impregnação, obtém-se uma situação claramente estimulatória da viabilidade/proliferação celular. Esta estimulação é igualmente observada quando se utiliza etanol como solvente de impregnação, mas o efeito não é tão acentuado.

Portanto, pode concluir-se que os objectivos previamente delineados no âmbito desta tese foram cumpridos, pois o sistema Bonelike®/*E. arvense*

revelou possuir um perfil com elevado potencial para futuras aplicações em estratégias de regeneração óssea.

Os resultados apresentados nesta tese podem servir como ponto de partida para uma série de outros estudos, que poderão complementar e aprofundar os resultados obtidos, como:

- Alterações no método de preparação do extracto, nomeadamente nos passos de extracção, de modo a alterar a composição do extracto, a fim de, dessa forma, perceber qual (ou quais) os compostos que efectivamente apresentam as propriedades pretendidas;
- Cromatografia bioguiada do extracto de *E. arvense*, de forma a tentar identificar os compostos existentes no mesmo;
- Avaliação do potencial mutagénico do extracto de *E. arvense*;
- Avaliação da resposta celular do sistema Bonelike[®]/*E. arvense* noutras linhagens celulares;
- Ensaios *in vivo* com recurso a modelos animais.

6. REFERÊNCIAS

1. **Junqueira L, Carneiro J.** *Histologia Básica 10 ed.* Rio de Janeiro : Guanabara, 2004.
2. **Barbosa, MA.** *Os materiais e a vida: um osso duro de roer.* s.l. : Fundação Calouste Gulbenkian, 1999.
3. **Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P.** Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998, 20, pp. 92-102.
4. **Van wynsberghe D, Noback CR, Carola R.** *Bones and bone tissue. Human anatomy and physiology.* s.l. : McGraw-Hill, 2000.
5. **Sasson S, Silva C.** *Biologia César e Sezar.* s.l. : Saraiva, 2007.
6. **Parfitt, AM.** The contribution of bone histology to understanding the pathogenesis and improving the management of osteoporosis. *Clin Invest Med.* 1982, 5(2-3), pp. 163-7.
7. **Ducy P, Desbois C, Boyce B et al.** Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996, 382 (6590), pp. 448-52.
8. **Herring, GM.** A comparison of bone matrix and tendon with particular reference to glycoprotein content. *Biochem J.* 1976, Vol. 159(3), 159(3), pp. 749-55.
9. **Farley JR, Baylink DJ.** Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism.* 1986, 35(6), pp. 563-71.
10. **Ducy P, Schinke T, Karsenty.** The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000, 289, pp. 1501-4.
11. **Thomas T, Lafage-Proust MH.** Contribution of genetically modified mouse models to the elucidation of bone physiology. *Rev Rhum Engl.* 1999, 66 (12), pp. 728-35.
12. **Lehtonen-Veromaa M, Mottonen T, Irjala K, Nuotio I, Leino A, Viikari J.** A 1-year prospective study on the relationship between physical activity,

markers of bone metabolism, and bone acquisition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85(10), pp. 3726-32.

13. **Tozum TF, Oppenlander ME, Koh-Paige AJ, Robins DM, McCauley LK.** Effects of sex steroid receptor specificity in the regulation of skeletal metabolism. *Calcif Tissue Int.* 2004, 75(1), pp. 60-70.
14. **Kamel S, Durand G.** *Bases cellulaires et moléculaires du remodelage osseux physiologique et de ses principaux déséquilibres pathologiques.* In *Biochimie pathologique.* Paris : Flammarion, 2003. pp. 221-38.
15. **Manolagas SC, Jilka RL.** Bone marrow, cytokines and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995, 332, pp. 305-11.
16. **Manolagas, SC.** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000, 21, pp. 115-37.
17. **Cheng H, Jiang W, Phillips FM et al.** Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins. *J Bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8), pp. 1544-52.
18. **Wan M, Cao X.** BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 328(3), pp. 651-7.
19. **Vladimirov BS, Dimitrov SA.** Growth factors - importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures. *Folia Med.* 2004, 46(2), pp. 11-7.
20. **Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA.** Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.* 2004, 34(3), pp. 402-11.
21. **Lanyon, LE.** Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993, 53 (sup.), pp. 102-7.
22. **Smith AN, Jouret F, Bord S et al.** Vacuolar H⁺ ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone. *J Am Soc Nephrol.* 2005, 16(5), pp. 1245-56.

23. **Stenbeck G, Horton MA.** Endocytic trafficking in actively resorbing osteoclasts. *J Cell Sci.* 2004, 117(6), pp. 827-36.
24. **Teitelbaum, SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000, 289, pp. 1504-8.
25. **Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ.** Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2004, 200(1), pp. 99-106.
26. **Lacey DL, Timms E, Tan HL et al.** Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998, 93(2), pp. 165-76.
27. **Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL.** Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology.* 1999, 140(9), pp. 4367-70.
28. **Faccio R, Grano M, Colucci S, Zallone AZ, Quaranta V, Pelletier AJ.** Activation of alphav beta3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 249(2), pp. 522-5.
29. **Hollmann W, Strüder HK, Tagarakis CV, King G.** Physical activity and the elderly. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007, 14(6), pp. 730-9.
30. **Seeman, E.** Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet.* 2002, 359, pp. 1841-50.
31. **Seeman, E.** Invited review: Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol.* 2003, 95, pp. 2142-51.
32. **Del Fattore A, Cappariello A, Teti A.** Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone.* 2008, 42(1), pp. 19-29.
33. **Colina M, La Corte R, De Leonardis F, Trotta F.** Paget's disease of bone: a review. *Rheumatol Int.* 2008.
34. **Barron MC, Rubin BR.** Managing osteoarthritic knee pain. *J Am Osteopath Assoc.* 2007, 107(Suppl 6).

35. **Silver FH, Doillon CJ.** *Biocompatibility: Interactions of Biological and Implantable Materials*. New York : VCH Publishers, 1989.
36. **Enderle J, Blanchard S, Bronzino J.** *Introduction to Biomedical Engineering. Second edition*. Burlington MA : Elsevier , 2005.
37. **Cao W, Hench LL.** Bioactive materials. *Ceramics International*. 1996, 22, pp. 493-507.
38. MIT OpenCourseWare | Materials Science and Engineering | 3.051J Materials for Biomedical Applications. *Free Online Course Materials | MIT OpenCourseWare*. [Online] Massachusetts Institute of Technology, 2006. <http://ocw.mit.edu/OcwWeb/Materials-Science-and-Engineering/3-051JSpring-2006/LectureNotes/index.htm>.
39. **Gutierrez M, Lopes M, Hussain N, Cabral A, Almeida L, Santos J.** Substitutos ósseos. Conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de medicina*. 2006, 19(4), pp. 153-162.
40. **Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM.** Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002, 23, pp. 4095-4103.
41. **Albee, FH.** Studies in bone growth. Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery*. 1920, 7, pp. 32-36.
42. **Levitt G, Crayton P, Monroe E, Condrate R.** Forming methods for apatite prosthesis. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1969, 3, pp. 683-685.
43. **Jarcho M, Bolen CH, Thomas MB, Bobick J, Kay JF, Doremus RH.** Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *Journal of Materials Science*. 1976, 11, pp. 2027-2035.
44. **Heness G, Ben-Nissan B.** Innovative Bioceramics. *Materials Forum*. 2004, Vol. 27.
45. **Ravaglioli A, Krajewski A.** *Bioceramics: materials properties applications*. London : Chapman and Hall, 1992.

46. **Bonfield W, Grynpas MD, Tully AE, Bowman J, Abram J.** Hydroxyapatite reinforced polyethylene - a mechanically compatible implant material for bone-replacement. *Biomaterials*. 1981, 2, pp. 185-186.
47. **Ioku K, Yoshimura M, Somiya S.** Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite ceramics with zirconia dispersion prepared by post-sintering. *Biomaterials*. 1990, 11, pp. 57-61.
48. **Santos J, Reis RL, Monteiro FJ, Knowles JC, Bonfield W.** Liquid phase sintering of hydroxyapatite by phosphate and silicate glass additions: structure and properties of the composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995, 6(6), pp. 348-352.
49. **Santos J, Hastings G, Knowles J.** *Sintered hydroxyapatite compositions and method for the preparation thereof*. WO 0068164 1999. Eur Pat.
50. **Lobato JV, Hussain N, Botelho CM, Mauricio AC, Afonso A, Ali N, Santos JD.** Assessment of Bonelike® graft with a resorbable matrix using an animal model. *Thin Solid Films*. 2006, 515, pp. 362-367 .
51. **Lopes MA, Santos JD, Monteiro FJ, Ohtsuki C, Osaka A, Kaneko S, Inoue H.** Push-out testing and histological evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composites implanted in the tibia of rabbits. *J Biomed Mater Res*. 2001, 54(4), pp. 463-9.
52. **Alimi, D, et al.** *Enciclopédia médica prática. Vencer a dor*. Lisboa : Selecções do Reader's Digest, SA, 2002.
53. **WHO.** *in Progress Report by the Director General*. Geneva : World Health Organization, 1991.
54. **Strasburger, Eduardo.** *Tratado de Botanica*. Barcelona : Manuel Marin, 1943.
55. **Pinho C, Pinho CS.** *As plantas infestantes mais frequentes nas principais culturas da região de entre douro e minho*. Porto : IDARN, 1998.
56. **Blanco, R.** Cavalinha. *Jardim de flores - o portal do verde*. [Online] Rose Aielo Blanco, 2008.
<http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A26cavalinha.htm>.

57. **Epstein, E.** The anomaly of silicon in plant biology. *Proc Natl Acad Sci.* 1994, 91, pp. 11-17.
58. **Cunha A, Silva A, Roque O.** *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia.* 2ª edição. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 2006.
59. **Roger, J.** *A saúde pelas plantas medicinais.* Toledo : Safeliz, 1996.
60. *equisetum arvense* in Flora of North America. *efloras.org*. [Online] U.S. National Science Foundation, Starr Foundation, Stanley Smith Horticultural Trust. http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=6205&flora_id=1.
61. **Botelho, C.** Silicon-substituted hidroxyapatite for biomedical applications. *Tese de doutoramento.* Porto : FEUP, 2005.
62. **Carlisle, E.** Essentiality and function of silicon. *Biochemistry of silicon and related problems.* Sweden : Proceedings of the 40th Nobel Symposium, 1977.
63. **Loeper, J.** Silice et artherosclerose. *Presse Medical.* 1958, pp. 66-883.
64. **Charnot Y, Peres G.** Contribution to study of endocrin regulation of silicic metabolism. *Annales d Endocrinologie.* 1971, pp. 31-397.
65. **Voronkov MG, Skorobogatova VI, Vugmeister EK, Makarskii VV.** Silicon in nuclei acids. *Doklady Biochemistry.* 1975, pp. 222-29.
66. **Schwarz K, Milne D.** Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature.* 1972, pp. 239-333.
67. **Schwarz, K.** Significance and functions of silicon in warm-blooded animals. *Biochemistry of silicon and related problems.* Sweden : Proceedings of the 40th Nobel Symposium, 1977.
68. **Keeting PE, Oursler MJ, Wiegand KE, Bonde SK, Spelsberg TC, Riggs LB.** Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1992, 11, pp. 7-1281.
69. **Hildebrand M, Higgins D, Busser K, Benjamin E.** Silicon-responsive cDNA clones isolated from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Gene.* 1993, 132(2), pp. 213-218.

70. **Reffitt D, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H, Evans B, Thompson R, et al.** Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*. 2003, pp. 32-127.
71. **McGee-Russel, SM.** Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem*. 1958, 6, pp. 22-42.
72. **Stein, GS.** Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. *Principles of Bone Biology*. Academic Press. 1996, pp. 69-86.
73. **Santos JD, Silva PL, Knowles JC, Talal S, Monteiro FJ.** Reinforcement of hydroxyapatite by adding P2O5-CaO glasses with Na2O, K2O and MgO. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 7. 1996, pp. 187-189.
74. **Van Wyk B, Wink M.** *Medicinal plants of the world*. Portland OR : Timber Press, 2004. p. 136.
75. **Wichtl, M.** *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*, 3 ed. Boca Raton FL : CRC Press, 2004. pp. 195-199.
76. **Milovanovic V, Radulovic N, Todorovic Z, Stankovic M, Stojanovic G.** Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian equisetum species. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007, 62, pp. 113-119.
77. **Pérez AL, Spears R, Gutman JL, Opperman LA.** Osteoblasts and MG63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot™MTA and White MTA. *International Endodontic Journal*. 36, pp. 564-570.
78. **Graefe EV, Veit M.** Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from Equisetum arvense. *Phytomedicine*. 1999, 6, pp. 239-46.
79. **Veit M, Bauer K, Beckert C, Kast B, Geiger H, Czygan F-C.** Phenolic characters of british hybrid taxa in Equisetum subgenus Equisetum. *Bioch System Ecol*. 1995, 23, pp. 79-87.
80. **Habauzit V, Horcajada M-N.** Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochem Rev*. 2008, 7, pp. 313-344.

81. **Dew TP, Day AJ, Morgan MRA.** Bone mineral density, polyphenols and caffeine: a reassessment. *Nutrition Res Reviews*. 2007, 20, pp. 89-105.
82. **Kim D-S, Takai H, et al.** Effects of quercetin and quercetin 3-glucuronide on the expression of bone sialoprotein gene. *J Cell Biochem*. 2007, 101, pp. 790-800.
83. **Prouillet C, Maziere JC, et al.** Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol*. 2004, 67, pp. 1307-1313.
84. **Bandyopadhyay S, Lion JM, et al.** Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. *Biochem Pharmacol*. 2006, 72, pp. 184-197.
85. **Radulovic N, Stojanovic G, Palic R.** Composition and antimicrobial activity of Equisetum arvense L. essential oil. *Phytother Res*. 2006, 20, pp. 85-88.
86. **Brause, B.** Infections with prostheses in bones and joints. [autor do livro] Bennet J, Dolin R Mandell G. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5 ed. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2000, pp. 1196-1200.
87. **Hudson MC, Ramp WK, Frankenburg KP.** *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiology Letters* . 1999, 173, pp. 279-284.

7. ANEXOS

Anexo I – Cálculos para a preparação da hidroxiapatite

Para preparar 100g de HA, a quantidade molar é dada por:

$$M(HA) = 1004,64 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow n = \frac{100}{1004,643} = 0,1 \text{ mol (HA)}$$

Pela estequiometria da reacção, é necessário que 1 mole de hidróxido de cálcio reaja com 0,6 moles de ácido fosfórico para produzir 0,1 moles de hidroxiapatite. As quantidades em massa a utilizar de cada um dos reagentes serão então, respectivamente:

$$M(Ca(OH)_2) = 74,09468 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 1 \times 74,0947 = 74,0947 \text{ g (Ca(OH)}_2)$$

$$M(H_3PO_4) = 97,995 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,6 \times 97,995 = 58,7970 \text{ g (H}_3\text{PO}_4)$$

Uma vez que o ácido fosfórico apresenta grau de pureza de cerca de 85%, a quantidade a utilizar deste reagente será:

$$p = \frac{m}{m'} \Leftrightarrow m' = \frac{m}{p} = \frac{58,7970}{0,8517} = 69,0350 \text{ g (H}_3\text{PO}_4)$$

Anexo II – Cálculos para a preparação do vidro

Preparação de 0.2 moles do vidro 65% P_2O_5 , 15% CaO , 10% CaF_2 e 10% Na_2O (% mol)

a) CaO – 15%

O óxido de cálcio necessário à obtenção do vidro com a composição referida é obtido por decomposição endotérmica de hidrogenofosfato de cálcio, de acordo com a seguinte equação química:



Assim, sendo que se pretende obter uma concentração de 15% de óxido de cálcio em 0,2 moles de vidro, a quantidade de hidrogenofosfato de cálcio a utilizar foi calculada do seguinte modo:

$$n = 0,15 \times 0,2 = 0,030 \text{ mol } (\text{CaHPO}_4)$$

$$M(\text{CaHPO}_4) = 136,06 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,030 \times 136,06 = 4,0818 \text{ g } (\text{CaHPO}_4)$$

b) P_2O_5 – 65%

De modo a obter uma concentração de 65% de pentóxido de fósforo em 0,2 moles de vidro, a quantidade de pentóxido de fósforo a utilizar seria:

$$n = 0,65 \times 0,2 = 0,130 \text{ mol } (P_2O_5)$$

Contudo, à semelhança do que foi já referido na alínea anterior, o hidrogenofosfato de cálcio decompõe-se segundo a reacção endotérmica traduzida pela seguinte equação química:



Assim, é necessário descontar à concentração anterior a quantidade de pentóxido de fósforo produzida por decomposição do hidrogenofosfato de cálcio. Pela estequiometria da reacção verifica-se que a quantidade de pentóxido de fósforo produzida é metade da quantidade de hidrogenofosfato de cálcio utilizada, pelo que (em conformidade com o cálculo da alínea anterior):

$$n = \frac{1}{2} (0,15 \times 0,2) = 0,015 \text{ mol } (P_2O_5)$$

Posto isto, a quantidade de pentóxido de fósforo a utilizar foi calculada do seguinte modo:

$$n = 0,130 - 0,015 = 0,115 \text{ mol } (P_2O_5)$$

$$M (P_2O_5) = 141,94 \text{ g / mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,115 \times 141,94 = 16,3231 \text{ g } (P_2O_5)$$

c) Na₂O – 10%

O óxido de sódio necessário à obtenção do vidro com a composição referida é obtido por decomposição endotérmica de carbonato de sódio, de acordo com a seguinte equação química:



Assim, sendo que se pretende obter uma concentração de 10% de óxido de sódio em 0,2 moles de vidro, a quantidade de carbonato de sódio a utilizar foi calculada do seguinte modo:

$$n = 0,1 \times 0,2 = 0,02 \text{ mol } (Na_2CO_3)$$

$$M (Na_2CO_3) = 105,99 \text{ g / mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,02 \times 105,99 = 2,1198 \text{ g } (Na_2CO_3)$$

d) CaF₂ – 10%

De modo a obter uma concentração de 10% de fluoreto de cálcio em 0,2 moles de vidro, a quantidade de fluoreto de cálcio a utilizar foi calculada do seguinte modo:

$$n = 0,1 \times 0,2 = 0,02 \text{ mol } (CaF_2)$$

$$M (CaF_2) = 78,08 \text{ g / mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,02 \times 78,08 = 1,5616 \text{ g } (CaF_2)$$

Anexo III – Fichas de DRX da HA, α -TCP e β -TCP

PDF#00-055-0898(RDB): QM=Star(S); d=Diffraction; l=Diffraction

Whitlockite, syn (Calcium Phosphate)

Ca₃ (P O₄)₂ Colorless, white, yellow

Radiation=CuK α Lambda=1.5418 Filter=Graph

Calibration= 2 θ =10.870-89.801 I/Ic(RIR)=S

Ref: Ermrich, M., Peters, F., Reinheim, Germany.

Private Communication (2004)

Rhombohedral - (Unknown), R-3c (167) Z=21 mp=

CELL: 10.4264 x 10.4264 x 37.376 <90.0 x 90.0 x 120.0> P.S=hR91.00 (Å)

Density(c)=3.074 Density(m)= Mwt=310.18 Vol=3518.78 F(30)=88.2(0.010,34/0)

Ref: Ibid.

Strong Lines: 2.88/X 2.61/7 3.21/5 1.73/3 1.93/3 3.46/3 2.76/2 5.21/2

General Comments: Cell parameters generated by least squares refinement.

Additional Patterns: To replace 00-009-0169.

Color: Colorless, white, yellow.

Sample Preparation: Prepared by heating a mixture of calcium hydrogen phosphate and calcium carbonate with "Ca"/"P" ratio of 1.5.

Unit Cell: Reference reports: a=10.4183(5), c=37.3464(23).

2-Theta	d(Å)	I(f)	(h k l)	Theta	1/(2d)	2pi/d	n ²												
29.652	3.0103	12.0	(3 0 0)	14.826	0.1661	2.0872													
10.870	8.1323	9.0	(0 1 2)	5.435	0.0615	0.7726													
13.642	6.4856	16.0	(1 0 4)	6.821	0.0771	0.9688													
14.235	6.2169	3.0	(0 0 6)	7.117	0.0804	1.0107													
17.019	5.2058	22.0	(1 1 0)	8.509	0.0960	1.2070													
18.456	4.8033	2.0	(1 1 3)	9.228	0.1041	1.3081													
20.231	4.3858	5.0	(2 0 2)	10.115	0.1140	1.4326													
21.388	4.1511	1.0	(0 1 8)	10.694	0.1204	1.5136													
21.859	4.0628	11.0	(0 2 4)	10.929	0.1231	1.5465													
22.234	3.9950	2.0	(1 1 6)	11.117	0.1252	1.5728													
25.761	3.4555	26.0	(1,0,10)	12.881	0.1447	1.8183													
26.201	3.3985	3.0	(2 1 1)	13.101	0.1471	1.8488													
26.525	3.3577	9.0	(1 2 2)	13.262	0.1489	1.8713													
27.450	3.2466	5.0	(1 1 9)	13.725	0.1540	1.9353													
27.805	3.2060	53.0	(2 1 4)	13.902	0.1560	1.9598													
28.626	3.1158	1.0	(0,0,12)	14.313	0.1605	2.0165													
28.741	3.1036	<1	(1 2 5)	14.370	0.1611	2.0245													

41.108	2.1940	13.0	(4 0 4)	20.554	0.2279	2.8638	59.603	1.5499	7.0	(3,2,16)	29.802	0.3226	4.0540
41.688	2.1648	11.0	(3,0,12)	20.844	0.2310	2.9024	60.363	1.5322	3.0	(1 5 8)	30.182	0.3263	4.1008
42.973	2.1030	2.0	(1,2,14)	21.486	0.2378	2.9877	60.846	1.5212	4.0	(2,1,22)	30.423	0.3287	4.1305
43.463	2.0804	5.0	(1,3,10)	21.732	0.2403	3.0202	61.011	1.5175	1.0	(3,3,12)	30.506	0.3295	4.1406
43.558	2.0761	6.0	(0,0,18)	21.779	0.2408	3.0264	61.569	1.5050	4.0	(6 0 0)	30.785	0.3322	4.1748
43.734	2.0682	3.0	(3 2 1)	21.867	0.2418	3.0380	61.904	1.4977	<1	(3,1,20)	30.952	0.3338	4.1952
43.941	2.0589	5.0	(2 3 2)	21.970	0.2428	3.0517	62.349	1.4881	<1	(5,1,10)	31.174	0.3360	4.2223
44.538	2.0327	10.0	(0 4 8)	22.269	0.2460	3.0911	62.579	1.4832	1.0	(4 3 1)	31.290	0.3371	4.2364
44.779	2.0223	5.0	(3 2 4)	22.389	0.2472	3.1070	63.392	1.4661	5.0	(4 3 4)	31.696	0.3410	4.2857
44.938	2.0155	1.0	(3,1,11)	22.469	0.2481	3.1174	63.857	1.4565	<1	(3 4 5)	31.928	0.3433	4.3138
45.329	1.9991	8.0	(2,2,12)	22.664	0.2501	3.1431	64.384	1.4459	2.0	(5 2 0)	32.192	0.3458	4.3456
46.031	1.9702	<1	(4 1 0)	23.015	0.2538	3.1892	64.695	1.4397	3.0	(0,4,20)	32.348	0.3473	4.3644
46.641	1.9458	2.0	(4 1 3)	23.321	0.2570	3.2291	65.211	1.4295	2.0	(4 3 7)	32.605	0.3498	4.3953
46.983	1.9324	30.0	(3 2 7)	23.491	0.2587	3.2514	65.376	1.4263	<1	(3,2,19)	32.688	0.3506	4.4052
48.002	1.8938	18.0	(2 3 8)	24.001	0.2640	3.3178	65.974	1.4148	3.0	(3 4 8)	32.987	0.3534	4.4410
48.409	1.8788	15.0	(4 1 6)	24.204	0.2661	3.3442	66.309	1.4085	7.0	(5 2 6)	33.154	0.3550	4.4610
49.778	1.8303	5.0	(0,1,20)	24.889	0.2732	3.4329	67.437	1.3876	5.0	(2,3,20)	33.718	0.3603	4.5280
49.901	1.8261	1.0	(3,1,14)	24.951	0.2738	3.4409	67.879	1.3797	1.0	(4,3,10)	33.939	0.3624	4.5541
50.318	1.8119	7.0	(3,2,10)	25.159	0.2760	3.4677	68.077	1.3761	1.0	(1 6 1)	34.039	0.3633	4.5658
50.741	1.7978	5.0	(5 0 2)	25.371	0.2781	3.4950	68.686	1.3654	<1	(5 2 9)	34.343	0.3662	4.6017
51.279	1.7802	5.0	(1 4 9)	25.639	0.2809	3.5295	68.975	1.3604	1.0	(3,4,11)	34.488	0.3675	4.6186
51.500	1.7731	9.0	(0 5 4)	25.750	0.2820	3.5437	69.323	1.3544	<1	(6 1 5)	34.661	0.3692	4.6390
52.641	1.7373	3.0	(3 3 0)	26.320	0.2878	3.6167	70.345	1.3372	<1	(1,1,27)	35.173	0.3739	4.6987
52.974	1.7271	34.0	(2,0,20)	26.487	0.2895	3.6379	70.610	1.3329	2.0	(3,3,18)	35.305	0.3751	4.7141
53.571	1.7093	9.0	(3,0,18)	26.785	0.2925	3.6759	71.089	1.3251	3.0	(1,2,26)	35.544	0.3773	4.7418
53.744	1.7042	1.0	(2 4 1)	26.872	0.2934	3.6869	71.351	1.3208	2.0	(6 1 8)	35.676	0.3786	4.7570
54.424	1.6845	8.0	(5 0 8)	27.212	0.2968	3.7300	71.788	1.3139	<1	(3,2,22)	35.894	0.3806	4.7823
54.627	1.6787	2.0	(2 4 4)	27.313	0.2978	3.7428	71.925	1.3117	2.0	(5,2,12)	35.963	0.3812	4.7902
54.942	1.6698	<1	(1,0,22)	27.471	0.2994	3.7628	72.454	1.3034	3.0	(4 4 0)	36.227	0.3836	4.8206
55.110	1.6651	4.0	(4,1,12)	27.555	0.3003	3.7734	72.837	1.2975	<1	(3,4,14)	36.418	0.3854	4.8425
56.120	1.6376	3.0	(2,3,14)	28.060	0.3053	3.8369	73.385	1.2892	3.0	(3 5 1)	36.693	0.3879	4.8739
56.558	1.6259	3.0	(0,5,10)	28.279	0.3075	3.8644	73.535	1.2869	3.0	(5 3 2)	36.767	0.3885	4.8824
56.645	1.6236	2.0	(2,2,18)	28.323	0.3080	3.8699	73.948	1.2807	<1	(0,2,28)	36.974	0.3904	4.9060
56.777	1.6202	<1	(5 1 1)	28.388	0.3086	3.8781	74.114	1.2783	<1	(2,3,23)	37.057	0.3912	4.9154
57.440	1.6030	6.0	(3 3 9)	28.720	0.3119	3.9196	75.355	1.2603	5.0	(4,2,20)	37.678	0.3967	4.9856
57.639	1.5979	3.0	(5 1 4)	28.820	0.3129	3.9321	75.869	1.2530	1.0	(4,3,16)	37.935	0.3990	5.0145
57.949	1.5901	1.0	(0,2,22)	28.975	0.3144	3.9514	75.987	1.2514	2.0	(6 2 1)	37.993	0.3996	5.0211
59.507	1.5522	9.0	(2,4,10)	29.753	0.3221	4.0480	76.122	1.2495	2.0	(2 6 2)	38.061	0.4002	5.0287

76.363	1.2461	3.0	(3,1,26)	38.182	0.4012	5.0422	82.076	1.1732	1.0	(5,1,22)	41.038	0.4262	5.3555
76.556	1.2435	3.0	(4,4,9)	38.278	0.4021	5.0530	83.639	1.1552	<1	(5,4,1)	41.819	0.4328	5.4389
76.732	1.2411	2.0	(6,2,4)	38.366	0.4029	5.0628	83.998	1.1512	1.0	(3,0,30)	41.999	0.4343	5.4579
77.943	1.2248	<1	(1,5,20)	38.971	0.4082	5.1301	84.180	1.1492	2.0	(7,1,9)	42.090	0.4351	5.4675
78.142	1.2221	1.0	(2,2,27)	39.071	0.4091	5.1411	85.668	1.1330	<1	(6,3,3)	42.834	0.4413	5.5457
78.380	1.2190	2.0	(7,0,10)	39.190	0.4102	5.1543	86.021	1.1293	3.0	(3,5,16)	43.010	0.4428	5.5640
78.877	1.2126	1.0	(0,4,26)	39.438	0.4123	5.1816	86.487	1.1244	9.0	(5,0,26)	43.244	0.4447	5.5883
79.115	1.2095	<1	(2,6,8)	39.557	0.4134	5.1947	86.710	1.1220	3.0	(4,5,8)	43.355	0.4456	5.5998
79.386	1.2061	<1	(5,3,11)	39.693	0.4146	5.2096	87.242	1.1166	3.0	(7,1,12)	43.621	0.4478	5.6273
79.686	1.2023	1.0	(4,4,12)	39.843	0.4159	5.2260	88.435	1.1046	<1	(5,4,10)	44.217	0.4527	5.6885
80.190	1.1960	2.0	(7,1,0)	40.095	0.4181	5.2535	88.761	1.1013	<1	(7,2,2)	44.381	0.4540	5.7051
80.641	1.1905	1.0	(7,1,3)	40.320	0.4200	5.2780	89.185	1.0972	1.0	(6,3,9)	44.593	0.4557	5.7266
80.960	1.1866	4.0	(5,2,18)	40.480	0.4214	5.2953	89.356	1.0955	3.0	(2,7,4)	44.678	0.4564	5.7352
81.397	1.1813	1.0	(2,3,26)	40.699	0.4233	5.3189	89.801	1.0913	<1	(7,2,5)	44.900	0.4582	5.7577
81.701	1.1777	<1	(1,3,28)	40.851	0.4246	5.3353							

PDF#00-009-0348(RDB): QM=Star(S); d=Guinier(114.6mm); I=Densitometer

Calcium Phosphate

Ca₃ (P O₄)₂

Radiation=CuK α 1 Lambda=1.5405 Filter=

Calibration= 2T=7.181-34.604 I/Ic(RIR)=S

Ref: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands.

Orthorhombic - Powder Diffraction Z=16 mp=1719.85°

CELL: 15.22 x 20.71 x 9.109 <90.0 x 90.0 x 90.0> P.S=0?208.00 (Å)

Density(c)=2.87 Density(m)=2.814 Mwt=310.18 Vol=2871.21 F(30)=16.5(0.019,95/0)

Ref: Ibid.

Strong Lines: 2.91/X 2.62/5 3.88/4 3.91/4 3.69/4 2.92/4 2.59/3 2.86/3

General Comments: Validated by calculated pattern 29-359.

Stated to be monoclinic pseudoorthorhombic by Mackay, Acta Crystallogr., 6 743 (1953).

Additional Diffraction Lines: Plus additional reflections.

Melting Point: 1993 K.

Sample Preparation: Sample obtained by heating α -phase at 1400 C.

Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

2-Theta	d(Å)	I(f)	(h k l)	Theta	1/(2d)	2pi/d	n ²						
24.098	3.6900	40.0	(1 3 2)	12.049	0.1355	1.7028							
7.181	12.3000	4.0	(1 1 0)	3.591	0.0407	0.5108							
24.299	3.6600	18.0	(1 5 1)	12.149	0.1366	1.7167							
12.098	7.3100	25.0	(1 1 1)	6.049	0.0684	0.8595							
25.354	3.5100	4.0	(4 0 1)	12.677	0.1425	1.7901							
12.970	6.8200	4.0	(0 2 1)	6.485	0.0733	0.9213							
25.803	3.4500	6.0	(0 6 0)	12.901	0.1449	1.8212							
14.069	6.2900	10.0	(1 3 0)	7.034	0.0795	0.9989							
26.587	3.3500	8.0	(3 1 2)	13.293	0.1493	1.8756							
14.461	6.1200	4.0	(2 2 0)	7.231	0.0817	1.0267							
26.750	3.3300	4.0	(4 3 0)	13.375	0.1502	1.8868							
15.185	5.8300	10.0	(2 0 1)	7.592	0.0858	1.0777							
28.309	3.1500	4.0	(2 6 0)	14.155	0.1587	1.9947							
17.104	5.1800	12.0	(0 4 0)	8.552	0.0965	1.2130							
28.587	3.1200	4.0	(2 4 2)	14.294	0.1603	2.0138							
19.494	4.5500	4.0	(0 0 2)	9.747	0.1099	1.3809							
29.063	3.0700	4.0	(4 4 0)	14.531	0.1629	2.0466							
20.495	4.3300	4.0	(3 1 1)	10.247	0.1155	1.4511							
29.258	3.0500	4.0	(5 0 0)	14.629	0.1639	2.0601							
20.737	4.2800	2.0	(2 4 0)	10.368	0.1168	1.4680							
29.655	3.0100	20.0	(5 1 0)	14.828	0.1661	2.0874							
21.290	4.1700	2.0	(0 2 2)	10.645	0.1199	1.5068							
30.304	2.9470	20.0	(1 1 3)	15.152	0.1697	2.1321							
22.206	4.0000	20.0	(1 5 0)	11.103	0.1250	1.5708							
30.602	2.9190	35.0	(4 0 2)	15.301	0.1713	2.1525							
22.724	3.9100	40.0	(2 0 2)	11.362	0.1279	1.6070							
30.753	2.9050	100.0	(1 7 0)	15.377	0.1721	2.1629							
22.902	3.8800	40.0	(2 4 1)	11.451	0.1289	1.6194							
31.249	2.8600	30.0	(5 1 1)	15.625	0.1748	2.1969							
23.329	3.8100	8.0	(4 0 0)	11.664	0.1312	1.6491							
31.750	2.8160	2.0	(0 7 1)	15.875	0.1776	2.2312							
23.836	3.7300	4.0	(3 3 1)	11.918	0.1340	1.6845							
32.101	2.7860	12.0	(5 3 0)	16.051	0.1795	2.2553							

32.328 2.7670 4.0 (1 7 1) 16.164 0.1807 2.2708
32.729 2.7340 <1 (1 3 3) 16.364 0.1829 2.2982
32.902 2.7200 <1 (2 2 3) 16.451 0.1838 2.3100
33.601 2.6650 4.0 (5 3 1) 16.801 0.1876 2.3577
34.182 2.6210 50.0 (0 4 3) 17.091 0.1908 2.3972
34.604 2.5900 30.0 (0 8 0) 17.302 0.1931 2.4259

PDF#00-055-0592(RDB): QM=Star(S); d=Diffraction; l=Diffraction

Hydroxylapatite, syn (Calcium Phosphate Hydroxide)

(Ca)10 (P O4)6 (O H)2

Radiation=CuK α 1 Lambda=1.540598 Filter=

Calibration=External(Si) 2T=10.833-69.707 I/Ic(RIR)=S

Ref: Tas, A.

Powder Diffraction, v16 p102 (2001)

Hexagonal - Powder Diffraction, P63/m (176) Z=1 mp=

CELL: 9.4189 x 9.4189 x 6.8827 <90.0 x 90.0 x 120.0> P.S=hP44.00

Density(c)=3.155 Density(m)= Mwt=1004.64 Vol=528.80 F(30)=252(0.003,38/0)

Ref: Ibid.

Strong Lines: 2.72/X 2.81/3 2.26/2 2.78/1 2.63/1 1.84/1 1.94/1 1.45/1

Additional Patterns: To replace 00-054-0022.

Analysis: Analysis by ICP-AES showed 0.55-0.60 wt.% K.

Sample Preparation: Molten salt synthesis using "K2 S O4" as fluxing agent.

"Ca10 (P O4)6 (O H)2" was calcined in air at 1000 C for 6 hours, mixed with "K2 S O4", heated at 1150 C for 3 hours, cooled and washed with "H2 O" at 90 C.

Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

2-Theta	d(Å)	I(f)	(h k l)	Theta	1/(2d)	2pi/d	n ²						
42.327	2.1336	3.0	(3 0 2)	21.164	0.2343	2.9449							
10.833	8.1600	8.0	(1 0 0)	5.417	0.0613	0.7700							
43.863	2.0624	6.0	(1 1 3)	21.931	0.2424	3.0465							
16.841	5.2601	4.0	(1 0 1)	8.421	0.0951	1.1945							
44.386	2.0393	3.0	(4 0 0)	22.193	0.2452	3.0811							
18.829	4.7092	3.0	(1 1 0)	9.414	0.1062	1.3342							
45.313	1.9997	2.0	(2 0 3)	22.656	0.2500	3.1421							
21.765	4.0800	9.0	(2 0 0)	10.883	0.1225	1.5400							
46.702	1.9434	9.0	(2 2 2)	23.351	0.2573	3.2331							
22.861	3.8868	8.0	(1 1 1)	11.431	0.1286	1.6165							
48.090	1.8905	4.0	(3 1 2)	24.045	0.2645	3.3236							
25.865	3.4419	7.0	(0 0 2)	12.932	0.1453	1.8255							
48.615	1.8713	3.0	(3 2 0)	24.308	0.2672	3.3577							
28.128	3.1699	2.0	(1 0 2)	14.064	0.1577	1.9821							
49.480	1.8406	9.0	(2 1 3)	24.740	0.2717	3.4137							
28.936	3.0832	8.0	(2 1 0)	14.468	0.1622	2.0379							
50.503	1.8057	6.0	(3 2 1)	25.251	0.2769	3.4796							
31.787	2.8128	26.0	(2 1 1)	15.894	0.1778	2.2338							
51.284	1.7800	9.0	(4 1 0)	25.642	0.2809	3.5299							
32.187	2.7788	13.0	(1 1 2)	16.093	0.1799	2.2611							
52.095	1.7542	4.0	(4 0 2)	26.047	0.2850	3.5818							
32.910	2.7194	100.0	(3 0 0)	16.455	0.1839	2.3105							
53.191	1.7206	3.0	(0 0 4)	26.596	0.2906	3.6517							
34.055	2.6305	12.0	(2 0 2)	17.028	0.1901	2.3886							
54.459	1.6835	2.0	(1 0 4)	27.229	0.2970	3.7322							
35.475	2.5284	3.0	(3 0 1)	17.738	0.1978	2.4850							
55.880	1.6440	7.0	(3 2 2)	27.940	0.3041	3.8219							
39.198	2.2964	3.0	(2 1 2)	19.599	0.2177	2.7361							
57.133	1.6109	5.0	(3 1 3)	28.566	0.3104	3.9004							
39.816	2.2622	18.0	(3 1 0)	19.908	0.2210	2.7775							
58.062	1.5873	2.0	(5 0 1)	29.031	0.3150	3.9584							
42.005	2.1492	2.0	(3 1 1)	21.003	0.2326	2.9235							
59.957	1.5416	3.0	(4 2 0)	29.978	0.3243	4.0758							

60.432 1.5306 3.0 (3 3 1) 30.216 0.3267 4.1050
61.684 1.5025 7.0 (2 1 4) 30.842 0.3328 4.1818
63.003 1.4742 8.0 (5 0 2) 31.501 0.3392 4.2621
63.444 1.4650 2.0 (5 1 0) 31.722 0.3413 4.2889

64.168 1.4502 9.0 (3 2 3) 32.084 0.3448 4.3326
65.038 1.4329 6.0 (5 1 1) 32.519 0.3489 4.3849
66.398 1.4068 2.0 (4 2 2) 33.199 0.3554 4.4663
69.707 1.3479 1.0 (5 1 2) 34.853 0.3709 4.6615